

**Untersuchungen zur Transkription der Genome der
Rudiviren SIRV1 und SIRV 2 des hyperthermophilen
*Archaeums Sulfolobus, in vivo und in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen Fakultät III

– Biologie und Vorklinische Medizin –

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Alexandra Kessler

aus Hardheim

Regensburg, 2004

Diese Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Karl O. Stetter und Dr. habil. David Prangishvili

Promotionsgesuch eingereicht am:

26. November 2004

Tag der mündlichen Prüfung:

20. Januar 2005

Prüfungsausschuß: Vorsitzender:

Prof. Dr. R. Wirth

1. Gutachter und Prüfer:

Prof. Dr. K. O. Stetter

2. Gutachter und Prüfer:

Prof. Dr. R. Sterner

3. Prüfer:

Prof. Dr. S. Schneuwly

“It is possible that nature invented DNA for the purpose of achieving regulation at the transcriptional rather than at the translational level. The level control in small DNA viruses and large RNA viruses should be interesting to study.”

A. CAMPBELL

1967

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	8
1.	Substanzen und ihre Bezugsquellen	8
1.1	Chemikalien.....	8
1.2	Enzyme, Vektoren und Reaktionskits	9
1.3	Oligonukleotidprimer und -sonden.....	10
2.	Verwendete Organismen und Viren	12
3.	Verwendete Kulturmedien und Kulturbedingungen	13
3.1	„ <i>Sulfolobus islandicus</i> “-Medium (SI-Medium)	13
3.2	Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	14
4.	Sterilisation	14
5.	Mikroskopie	15
5.1	Phasenkontrastmikroskopie	15
5.2	Bestimmung von Zellzahlen	15
6.	Virusvermehrung und -präparation.....	15
6.1	Tropf-Test	15
6.2	Virusvermehrung	16
6.3	Viruspräparation.....	16
6.4	Plaque-Test	17
7.	Molekulargenetische Methoden	17
7.1	Isolierung von Nukleinsäuren	17
7.1.1	Puffer und Lösungen.....	17
7.1.2	DNA-Isolierung aus Viren.....	17
7.1.3	RNA-Isolierung aus virusinfizierten Zellen	18
7.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	19
7.2.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	19
7.2.2	Konzentrationsbestimmung mittels Ethidiumbromidplatten.....	19
7.3	Gelelektrophorese	20

7.3.1 Puffer und Lösungen.....	20
7.3.2 Native Agarose-Gelelektrophorese	20
7.3.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	21
7.3.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
7.3.5 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
7.4 Reinigung von DNA aus Agarosegelen	22
7.5 Reinigung von DNA aus nativen Polyacrylamidgelen	23
7.6 Autoradiographie	24
7.7 Restriktionshydrolyse	24
7.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	24
7.8.1 Standard-PCR.....	24
7.8.2 Kolonie-PCR.....	26
7.8.3 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	26
7.8.4 Ligation von PCR-Produkten.....	26
7.8.5 Einführung von Restriktionsschnittstellen.....	26
7.8.6 Biotinylierung von DNA-Fragmenten.....	27
7.8.7 ³² P-Markierung von DNA-Fragmenten.....	27
7.9 Klonierung und Plasmidpräparation	27
7.9.1 Puffer und Lösungen.....	27
7.9.2 Herstellung kompetenter Zellen	28
7.9.3 Transformation von <i>E. coli</i>	28
7.9.4 Plasmidpräparation	29
7.10 Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA	29
7.11 Nachweis virusspezifischer Transkripte in Gesamt-RNA aus virusinfizierten Zellen.....	29
7.11.1 Herstellung ³² P-markierter dsDNA-Sonden	29
7.11.2 Herstellung ³² P-markierter Oligonukleotidsonden und Primer ...	30
7.11.3 Northern Blotting	30
7.11.4 Hybridisierung mit radioaktiv markierten dsDNA-Sonden	31
7.11.5 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotid- sonden.....	32
7.12 Identifizierung von Transkriptionsstartpunkten und Promotorregionen.....	33
7.12.1 Puffer und Lösungen	33

7.12.2 Primer-Verlängerungs-Analyse („Primer Extension“)	34
7.12.3 Manuelle Sequenzierung von PCR-Produkten	34
8. Proteinchemische Methoden	35
8.1 Magnetische DNA-Affinitätsreinigung nativer DNA-Bindeproteine aus Rohextrakt	35
8.1.1 Puffer und Lösungen	35
8.1.2 Herstellung von „ <i>Sulfolobus islandicus</i> “ Rohextrakten	36
8.1.3 Durchführung	36
8.2 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	37
8.2.1 Puffer und Lösungen	38
8.2.2 Durchführung der Proteinexpression	38
8.3 Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	39
8.3.1 Puffer und Lösungen	39
8.3.2 Reinigung von rekombinatem ORF 56-Protein	39
8.3.3 Reinigung des rekombinanten Transkriptionsfaktors SSo0048	40
8.4 Analyse von Proteinlösungen	40
8.4.1 Proteinmengenbestimmung nach Bradford	40
8.4.2 SDS-PAGE nach Laemmli	41
8.4.3 Coomassie Färbung und Trocknung von SDS-Gelen	42
8.4.4 Silberfärbung von SDS-Gelen	43
8.4.5 Massenspektroskopie	44
9. Untersuchung von DNA-Protein-Interaktionen	44
9.1 Gel-Verzögerungstests („Electric Mobility Shift Assay“, EMSA)	44
9.1.1 Herstellung eines 250 bp langen Promotortemplates	44
9.1.2 Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotidtemplates	45
9.1.3 Durchführung	45
9.2 <i>In vitro</i> -Transkription	46
9.2.1 Puffer und Lösungen	46
9.2.2 Durchführung	46
9.3 DNase I Footprinting	48
9.3.1 Puffer und Lösungen	48
9.3.2 Durchführung	48

III. ERGEBNISSE	50
A) Untersuchung der Transkription der Genome der Viren SIRV1 und SIRV2 <i>in vivo</i>.....	50
1. Nachweis virusspezifischer Transkripte in „<i>Sulfolobus islandicus</i>“ REN2H1 und LAL14/1 in Abhängigkeit des Infektionszyklus	50
2. Transkriptionskarten der Viren SIRV1 und SIRV2.....	60
3. Vergleich der Transkriptionskarten von SIRV1 und SIRV2	63
4. Identifizierung von Transkriptionsstartpunkten und Promotorsequenzen.....	64
B) Untersuchungen zur Regulation der Transkription der Genome der Viren SIRV1 und SIRV2	67
1. Isolierung und Identifizierung eines neuen Transkriptionsfaktors aus „<i>Sulfolobus islandicus</i>“.....	67
1.1 Isolierung eines Transkriptionsfaktors aus Rohextrakt mittels magnetischer DNA-Affinitätsreinigung	67
1.2 Untersuchung des 14 kDa Proteins im rekonstituierten <i>in vitro</i> -Transkriptionssystem von <i>Sulfolobus</i>	70
1.3 Identifizierung des 14 kDa Proteins mittels Massenspektroskopie und Sequenzdatenanalyse	73
1.4 Klonierung und heterologe Expression des Transkriptionsfaktors SSo0048	73
1.5 Reinigung des rekombinanten Transkriptionsfaktors SSo0048.....	75
1.6 Untersuchung von SSo0048 im rekonstituierten <i>in vitro</i> -Transkriptionssystem von <i>Sulfolobus</i>	76
1.7 Identifizierung der DNA-Bindestelle von SSo0048 durch DNase I-Footprinting.....	78

2.	Untersuchungen am viruscodierten ORF 56-Protein	80
2.1	Klonierung und heterologe Expression des ORF 56-Proteins	80
2.2	Reinigung des rekombinanten ORF 56-Proteins	81
2.3	DNA-Bindungsstudien mit rekombinant hergestelltem ORF 56-Protein.....	82
2.3.1	Nachweis der DNA-Bindeeigenschaft des ORF 56-Proteins	82
2.3.2	Nachweis der sequenzspezifischen Bindung des ORF 56-Proteins	85
2.4	Untersuchung des ORF 56-Proteins im rekonstituierten <i>in vitro</i> - Transkriptionssystem von <i>Sulfolobus</i>	89
3.	Untersuchung der Virus-Gesamtproteinfraktion im rekonstitu-	
	ierten <i>in vitro</i>-Transkriptionssystem von <i>Sulfolobus</i>	91
IV.	DISKUSSION.....	92
V.	ZUSAMMENFASSUNG.....	101
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	103

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APS	Ammoniumpersulfat
bidest	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BBR	Bakterien-Bank-Regensburg
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	„copy“ DNA, komplementäre DNA
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
ds	doppelsträngig
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ed	Editor
eds	Editoren
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
F	Vorwärts
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
knt	Kilonukleotide
λ	Wellenlänge
M	Molar
min.	Minute(n)
m.o.i.	„multiplicity of infection“
MOPS	3-Morpholinpropansulfonsäure
N	Normal
NTP	Nukleosidtriphosphate (ATP, CTP, GTP, UTP)
OD	optische Dichte
ORF	„Open reading frame“
p.f.u.	„plaque forming units“
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymersase-Ketten-Reaktion
Poly [dl, dC]	Poly(deoxyinosin-deoxycytosin)
R	Rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
tRNA	„transfer“ RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
ss	einzelsträngig
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Species
Tab.	Tabelle
TBP	TATA-Bindeprotein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFB	Transkriptionsfaktor B
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TZ	Tischzentrifuge
U	Unit(s)
ÜN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-galactopyranosid
Z/ml	Zellen pro Mililiter

IUPAC-Code:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
B	G/C/T
D	A/G/T
H	A/C/T
K	G/T
M	A/C
R	A/G
S	G/C
V	A/G/C
W	A/T
Y	C/T

I. EINLEITUNG

Im Gegensatz zu der großen Anzahl bekannter Viren von Bakterien und Eukaryonten sind innerhalb der Archaeen bisher nur wenige Viren entdeckt und in Details erforscht worden (zusammengefasst in Prangishvili *et al.*, 2001). Die morphologische Diversität der archaeellen Viren ist bemerkenswert und im Fall der doppelsträngigen DNA-Viren, die hyperthermophile Archaeen infizieren, außergewöhnlich und einzigartig für prokaryontische Virus-Wirt Systeme. Die Viren der Euryarchaeota, die bisher nur aus mesophilen und gemäßigt thermophilen Vertretern isoliert wurden, weisen größtenteils einen Kopf-Schwanz-Struktur auf und sind somit im Wesentlichen den drei Virusfamilien *Myoviridae*, *Siphoviridae* oder *Podoviridae* zuzuordnen. Zu diesen Familien gehören ebenfalls 97% aller bekannten Viren von Bakterien (Ackermann, 2001). Dem gegenüber zeigen die Viren der hyperthermophilen Crenarchaeota eine außergewöhnliche morphologische Vielfalt, und werden daher in sechs neue Virusfamilien eingeteilt: die spindelförmigen *Fuselloviridae* (SSV1, SSV2, SSK1 und SSVRH; Zillig *et al.*, 1996; Stedman *et al.*, 2003; Weidenheft *et al.*, 2004), die flexiblen, filamentösen *Lipothrixviridae* (TTV1-4, SIFV und AFV1; Zillig *et al.*, 1996; Arnold *et al.*, 2000a; Bettstetter *et al.*, 2003), die starren, stäbchenförmigen *Rudiviridae* (SIRV1 und SIRV2; Prangishvili *et al.*, 1999), die tröpfchenförmigen *Guttaviridae* (SNDV; Arnold *et al.*, 2000b), sowie die sphärischen *Globuloviridae* (PSV; Häring *et al.*, 2004; zusammengefasst in Abb. 1) und die zwei-füssigen *Bicaudaviridae* (Häring *et al.*, in Vorbereitung). Bisher wurden mehr als zwei Dutzend dieser Viren isoliert und konnten in Vertretern der Genera *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Thermoproteus* und *Pyrobaculum* (Stetter, 1996; Huber und Stetter, 1999) vermehrt werden.

Neben den deutlich unterschiedlichen Morphotypen, scheint auch die Organisation der Genome der Viren der hyperthermophilen Crenarchaeota einzigartig zu sein. Mehr als 90% aller Leserahmen der bisher sequenzierten Genome konnte keine Funktion zugeordnet werden. Darüber hinaus zeigen sie keinerlei Homologie zu Sequenzen, die in öffentlichen Datenbanken hinterlegt worden sind (zusammengefasst in Prangishvili und Garrett, 2004).

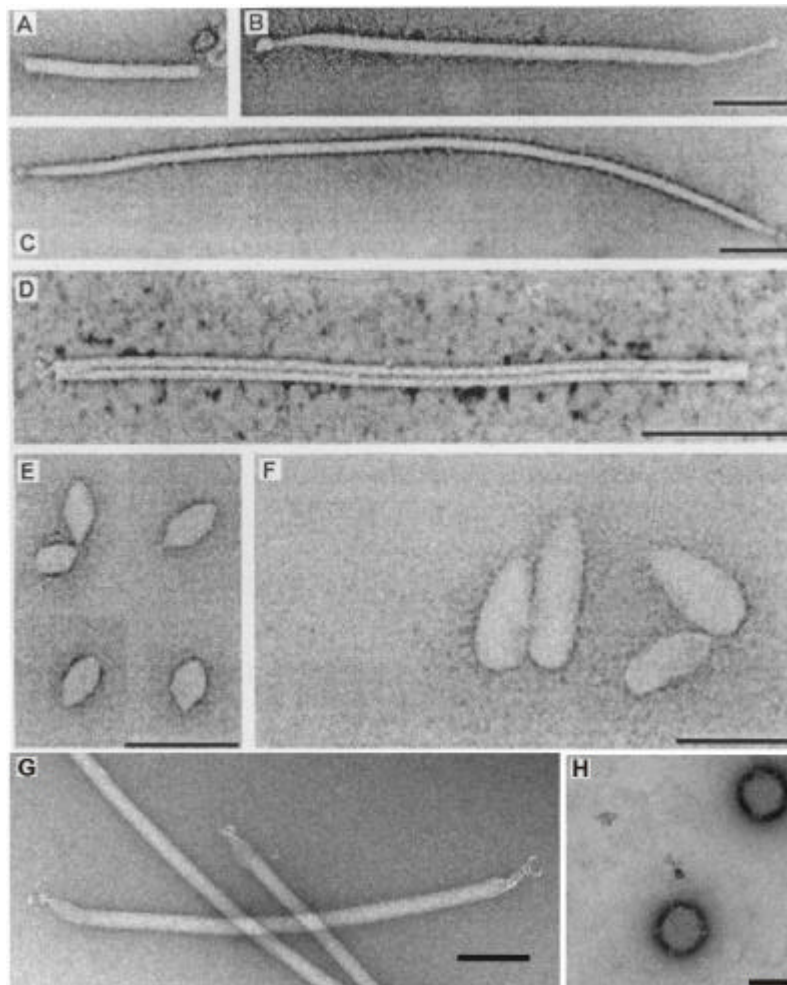


Abbildung 1: Übersicht über Vertreter der Viren von Crenarchaeota (modifiziert nach Prangishvili, 2003; Betstetter *et al.*, 2003; Häring *et al.*, 2004). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von: **A** Lipothrixvirus TTV1, **B** Lipothrixvirus TTV2, **C** Lipothrixvirus SIFV, **D** Rudivirus SIRV2, **E** Fusellovirus SSV1, **F** Guttavirus SNDV, **G** Lipothrixvirus AFV1, **H** Globulovirus PSV. Maßstab A-F: 200 nm, G und H: 100 nm.

Auch im Hinblick auf die Virus-Wirt-Interaktion sind die Viren der Crenarchaeota außergewöhnlich. Die überwiegende Mehrheit der bis heute beschriebenen doppelsträngigen DNA Viren, die Bakterien und Euryarchaeota infizieren, tötet letztendlich die Wirtszelle mit der Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel. Im Gegensatz dazu kommt es bei den meisten crenarchaeellen Viren nicht zur Abtötung oder Lyse der Wirtszelle. Die Viren verfolgen eine Strategie der „produktiven Infektion“. Sie verbleiben in der Wirtszelle in einem so genannten Trägerstadium („*carrier state*“). Im Fall des zur Lysogenie befähigten Fussellovirus SSV1 von *Sulfolobus*, konnte eine Induktion der Virusproduktion nach UV-Bestrahlung beobachtet werden (Martin *et al.*, 1984; Schleper *et al.*, 1992). Allerdings führte auch

dort die induzierte Virusproduktion nicht zur Lyse der Zelle. In allen Fällen findet eine Replikation sowohl der infizierten Zellen, als auch des Virus statt. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Wirtszellen ist dabei jedoch verlangsamt, was eine virusbedingte Modifikation spezifischer Zellfunktionen vermuten lässt.

Eine Änderung der Transkription des Wirtsgenoms als Folge einer Infektion ist für bakterielle Virus-Wirt Systeme beschrieben (Molineux, 1999; Mosig, 1999). Auch die Regulation der Genexpression selbst ist bei Bakteriophagen gut untersucht. Die Transkription der Phagengene unterliegt in der Regel einer zeitlichen Kontrolle. Meist nutzen die Bakteriophagen die Transkriptionsmaschinerie des Wirtes. Die zeitliche Regulation der Transkription wird mittels alternativer Sigmafaktoren, die die Spezifität der Wirts-RNA-Polymerase ändern, gewährleistet. Aber auch komplexere Regulationsmechanismen sind bekannt. Beispielsweise wird die zeitliche Abfolge der Transkription der DNA des *E. coli* Phagen T4 durch eine Kaskade von kovalenten und nicht kovalenten Modifikationen der RNA-Polymerase, sowie durch spezifische DNA-Bindeproteine und den Prozess der DNA-Replikation gesteuert (Mosig, 1999; Miller *et al.*, 2003). Die Promotoren der früh transkribierten Gene enthalten die Promotorkonsensussequenz von *E. coli* und werden dadurch von der Wirts-RNA-Polymerase und dem σ^{70} -Faktor erkannt. Die Expression des Anti-Sigmafaktors AsiA, der durch die Bildung von AsiA- σ^{70} -Heterodimeren die RNA-Polymerase modifiziert, sowie die Expression des DNA-bindenden Transkriptionsaktivators MotA führt zur Transkription der mittleren Gene (Hinton *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 2003). Die Transkription der späten Gene wird wiederum durch drei Proteine initiiert, die mit der Wirts-RNA-Polymerase assoziieren: dem alternativen σ^{55} -Faktor, dem Helferprotein gp33 und dem eigentlich für die Prozessivität der DNA-Replikation verantwortlichen gp 45 (Williams *et al.*, 1994). Beim Bakteriophagen Lambda erfolgt die zeitliche Regulation der Genexpression im lytischen Zyklus über den Mechanismus der Antitermination. Nacheinander werden Gene transkribiert, die für Antiterminationsfaktoren kodieren und das Überlesen der Terminationssignale der früheren Gene ermöglichen (Friedmann und Gottesman, 1982). Auch die Repressor-gesteuerte Regulation der Transkription ist bekannt. Ebenfalls beim Lambda-Phagen führt die Synthese eines Repressorproteins zur Aufhebung des Antiterminationsmechanismus. Die Transkription der lytischen Gene wird abgeschaltet und der Phage geht in den lysogenen Zyklus über (Ptashne, 1992).

Die Mechanismen und die Kontrolle der Genexpression von Viren hyperthermophiler Archaeen sind noch weitgehend unerforscht. In einigen Fällen wurden Regulationsmechanismen beobachtet, jedoch nicht aufgeklärt (Prangishvili *et al.*, 2001). Auch über die grundlegenden Prozesse der Transkription der Genome von Viren hyperthermophiler Archaeen ist wenig bekannt. Die einzigen Studien zur Transkription wurden am Virus SSV1 von *Sulfolobus* durchgeführt, allerdings wurde auch hier die Transkription nur in Abhängigkeit der UV-induzierten Virus-Produktion untersucht und nicht in Abhängigkeit des Infektionsszyklus. Mittels Northern-Analysen konnten acht konstitutive und ein UV-induzierbares Transkript nachgewiesen werden, und mittels Nuklease-S1-Kartierung wurden die Promotorregionen und Terminationsstellen bestimmt (Reiter *et al.*, 1987; Reiter *et al.*, 1988a; Reiter *et al.*, 1988b). Diese Ergebnisse und die Arbeiten an *Methanococcus vannielii* (Thomm und Wich, 1988) ermöglichten die Identifizierung archaeeller Promotorsequenzen und zeigten deren Ähnlichkeiten zu TATA Box enthaltenden Promotoren der eukaryontischen RNA-Polymerase II. Dies bestätigte die ursprüngliche Beobachtung, der Ähnlichkeit des archaeellen Transkriptionssapparates mit der Maschinerie des eukaryontischen RNA-Polymerase II-Systems (Zillig *et al.*, 1979; Prangishvili *et al.*, 1982; Huet *et al.*, 1983; Zillig *et al.*, 1993).

Der Zusammenbau des eukaryontischen RNA-Polymerase-II-Präinitiationskomplexes wird durch die Interaktion zahlreicher Transkriptionsfaktoren bestimmt (Roeder, 1996). Die Komplexbildung an den Promotor beginnt mit der Bindung des Faktors TFIID an eine Region, die sich von der TATA-Box über einen Bereich stromaufwärts davon erstreckt. TFIID besteht aus dem an die TATA-Box bindenden TATA-Bindeprotein (TBP) und verschiedenen weiteren Untereinheiten, die als TBP-assoziierte Faktoren (TAFs) bezeichnet werden. Die Bindung von TFIID wird durch die Anlagerung des Faktors TFIIA stabilisiert. Es folgt die Bindung von TFIIIB, was schließlich zur Rekrutierung des RNA-Polymerase-TFIIF-Komplexes führt. Der Präinitiationskomplex wird durch die Bindung der Faktoren TFIIIE und TFIIH weiter vervollständigt (Roeder, 1996).

Die Entwicklung von *in vitro*-Transkriptionssystemen für einige Vertreter der Archaeen (Frey *et al.*, 1990; Hausner *et al.*, 1991; Hudepohl *et al.*, 1990; Hethke, *et al.*, 1996; Qureshi *et al.*, 1997; Darcy *et al.*, 1999) ermöglichte die archaeellen, an der spezifischen Initiation der Transkription beteiligten Faktoren, zu identifizieren. Der

archaeelle Präinitiationskomplex setzt sich aus dem TATA-Bindeprotein (TBP), dem zum eukaryontischen TFIIB homologen Transkriptionsfaktor B (TFB) und der RNA-Polymerase, einem Multienzymkomplex aus mehreren Untereinheiten, zusammen. Somit scheint eine vereinfachte Version des eukaryontischen Polymerase II-Systems vorzuliegen. Zwar sind bei den Archaeen mit den Genen für die Transkriptionsfaktoren TFE und TFS die Homologe zu den eukaryontischen Faktoren TFIIS und TFIIEa vorhanden, allerdings konnte eine von diesen Faktoren unabhängige Transkription vieler archaeeller Promotoren in *in vitro*-Experimenten demonstriert werden. In Experimenten, in denen ein vergleichbar reduziertes eukaryontisches Transkriptionssystem, bestehend aus TBP, TFIIB, der RNA-Polymerase-30-Untereinheit von TFIIF und der RNA-Polymerase, zur Transkription einiger eukaryontischer Promotoren eingesetzt wurde, konnte dessen Aktivität nachgewiesen werden (Tyree *et al.*, 1993).

Während die Ähnlichkeit der basalen archaeellen Transkriptionsmaschinerie zum eukaryontischen RNA-Polymerase-II-System überzeugt, grenzen sich die wenigen, bisher identifizierten, archaeellen Transkriptionsregulatoren davon ab und weisen eher Homologie zu bakteriellen Regulatoren auf. Am häufigsten findet man bei den Archaeen Regulatoren der Lrp (*leucine-responsive regulatory protein*)-Familie. *In vitro*-Untersuchungen an den archaeellen Lrp-Proteinen LrpA von *Pyrococcus furiosus* und LysM von *Sulfolobus solfataricus* sprechen dafür, dass die archaeellen, wie die bakteriellen Lrps, Transkriptionsfaktoren darstellen, die an der Regulation des Aminosäurestoffwechsels beteiligt sind. Dabei binden die entsprechenden Aminosäuren als Liganden. Darüber hinaus wurde auch eine Liganden-unabhängige negative Autoregulation beobachtet (Bell und Jackson, 2000a; Brinkman *et al.*, 2000; Brinkman *et al.*, 2002). Im Allgemeinen ist jedoch nur wenig über die Regulation der Transkription von Archaeen bekannt. Obwohl zahlreiche Modellsysteme, wie die Hitzeschockantwort, die Gasvesikel-Bildung oder die Expression von Bakteriorhodopsin bei halophilen Archaeen Gegenstand intensiver Untersuchungen sind, konnten viele der *cis*-und *trans*-agierenden Faktoren nach wie vor nicht identifiziert werden. Einige wenige Regulatoren konnten etwas genauer charakterisiert werden. Dazu gehört zum Beispiel der MDR1-Repressor der ABC-Transporter-Gene von *Archaeoglobus fulgidus* (Bell *et al.*, 1999a) oder das SaLrp Protein von *Sulfolobus acidocaldarius* (Enoru-Eta *et al.*, 2000). In beiden Fällen handelt es sich um Homologe der bakteriellen Regulation. Aber auch archaeen-

spezifische Regulatoren wurden identifiziert, z.B. der in der Regulation der Methanogenese von *Methanobacterium thermoautotrophicum* involvierte Transkriptionsfaktor Tfx (Hochheimer *et al.*, 1999), der negativ autoregulierte Faktor Lrs14 von *Sulfolobus solfataricus* (Napoli *et al.*, 1999; Bell und Jackson, 2000a), der an der Hitzeschockantwort von *Pyrococcus furiosus* beteiligte Faktor Phr (Vierke *et al.*, 2003) oder der an der Regulation der Gasvesikelsynthese von Halobakterien beteiligte Faktor GvpE (Krüger *et al.*, 1998).

Mit den zahlreichen und vielfältigen Viren hyperthermophiler Archaeen stehen völlig neue, und mit Ausnahme des Virus SSV1 von *Sulfolobus*, bisher noch nicht untersuchte Modellsysteme zur Erforschung molekularbiologischer Prozesse zur Verfügung. Ihre Genome bieten neue Ansatzpunkte zur Beantwortung bislang ungelöster Fragen zu grundlegenden genetischen und biochemischen Prozessen der Archaeen.

In vorliegender Arbeit wurden die beiden nah verwandten Rudiviren von *Sulfolobus*, SIRV1 (Variante VIII) und SIRV2 (Prangishvili *et al.*, 1999) untersucht. Beide Viren wurden erstmals aus Anreicherungskulturen ihrer ursprünglichen Wirte, *Sulfolobus islandicus* KVEM10H3 und HVE10/2 isoliert (Zillig *et al.*, 1994; Zillig *et al.*, 1998). Die Propagation von SIRV1(VIII) erfolgte in *S. islandicus* REN2H1, von SIRV2 in *S. islandicus* LAL14/1. Bei den Viren handelt es sich um starre, stäbchenförmige Partikel mit einem Durchmesser von 23 nm und einer Länge von 800 bis 900 nm. Die linearen doppelsträngigen DNA-Genome beider Viren sind vollständig sequenziert (Blum *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2001). Sie sind 32312 (SIRV1; AJ344259) bzw. 35502 (SIRV2; AJ414696) Basenpaare lang. Die Enden der linearen DNA-Stränge sind kovalent verknüpft, sodass eine kontinuierliche Polynukleotidkette entsteht. An den Termini befinden sich „*inverted terminal repeats*“ (ITRs) mit einer Länge von 2029 und 1628 Basenpaaren, die eine Vielzahl an direkten Wiederholungssequenzen enthalten. Die Genome weisen eine sehr starke Ähnlichkeit in ihrer Organisation auf. Sie bestehen aus Blöcken von gut konservierten Bereichen, die 74 bis 94% identisch sind. Sie werden durch Abschnitte mit geringer oder keiner Ähnlichkeit voneinander getrennt. Die Genome enthalten 45 (SIRV1) bzw. 54 (SIRV2) offene Leserahmen (ORFs), die länger als 150 Nukleotide sind. 44 davon sind zueinander homolog. Die Funktionen von zwei der Leserahmen konnten durch Homologievergleiche und später experimentell identifiziert werden. Dabei handelt es sich um eine dUTPase

(Prangishvili *et al.*, 1998) und eine Holliday-junction-Resolvase (Birkenbihl *et al.*, 2001). Das Strukturprotein des Virus (ORF 134) konnte durch N-terminale Sequenzierung identifiziert werden (Peng *et al.*, 2001). Der GC-Gehalt beider Virus-Genome ist mit 25% im Vergleich zu 37% des Genoms von *S. solfataricus* extrem niedrig (She *et al.*, 2001).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine erste detaillierte Transkriptionsanalyse dieser beiden crenarchaeellen Viren in Abhängigkeit des Infektionszyklus durchzuführen. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte die Transkription der Rudiviren SIRV hinsichtlich möglicher Regulationsmechanismen untersucht werden. Die Analyse der Virus-Promotorelemente sollte erste Hinweise liefern, welche Faktoren bei der Transkription der Genome von SIRV1 und SIRV2 eine Rolle spielen könnten. Mögliche, an der Regulation der Transkription beteiligte Proteine sollten isoliert, identifiziert und molekularbiologisch charakterisiert werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Substanzen und ihre Bezugsquellen

1.1 Chemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller/Firma</u>
Acrylamid-Bis-Fertiglösung (30%, 37,5:1)	Severn Biotech Ltd, Kidderminster, UK
Acrylamid-Bis-Fertiglösung (8%, 19:1, 7 M Harnstoff)	Severn Biotech Ltd, Kidderminster, UK
Agarose, NEEO	Roth, Karlsruhe
Agarose SeaKem® LE	Biozym, Oldendorf
Agarose SeaKem® ME	Biozym, Oldendorf
Aqua Phenol	Appligene, Heidelberg
Bacto Agar	Difco, Detroit Michigan, USA
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Cäsiumchlorid	Biomol, Hamburg
Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Boehringer, Mannheim
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen
DNA aus Heringssperma	Boehringer, Mannheim
Ethanol _{absolut}	J. T. Baker, Deventer, Holland
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen
Gelrite	Roth, Karlsruhe
Guanidin-HCl	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kupferchlorid (CuCl ₂)	Riedel de Haën, Seelze
Loading Dye Solution	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Lysozym	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Nonidet P-40 (IGEPAL CA-630)	Sigma, Deisenhofen

Nukleosid-Triphosphate (NTPs)	Amersham Biosciences, Freiburg
N-Lauryl-Sarkosin	Sigma, Deisenhofen
Polyvinylpyrrolidon	Sigma, Deisenhofen
RNA-Größenstandard	Life Technologies, Gaithersburg, USA
Rubidiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Tris	USB, Braunschweig
Trypton	Difco, Detroit, USA
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D -galaktopyranosid (X-gal)	Roth, Karlsruhe

Alle nicht in der Liste aufgeführten Substanzen wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Der Reinheitsgrad aller Substanzen war sofern nicht anders angegeben p.a.

1.2 Enzyme, Vektoren und Reaktionskits

AmpliTaQ DNA Polymerase	Perkin Elmer, Weiterstadt
Pfu Turbo [®] DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Desoxyribonuklease I	Roche, Mannheim
DNase, RNase-frei	Qiagen, Hilden
<i>Cla</i> I, <i>Eco</i> RI, <i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	NEB, Frankfurt
RNase, DNase-frei	Boehringer, Mannheim
RNasin	Promega, Mannheim
T4-Polynukleotidkinase	Promega, Mannheim
AMV-Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
pET Expressions System 30a	Novagen, Madison, USA
pUC18	Invitrogen, Karlsruhe
pDrive	Qiagen, Hilden
pBluescript II SK	Stratagen, La Jolla, USA
Megaprime [™] DNA Labelling System	Amersham Biosciences, Freiburg
Probe Quant [™] G-50 Micro Columns	Amersham Biosciences, Freiburg

RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN PCR Cloning ^{plus} Kit	Qiagen, Hilden
<i>fmoI</i> ® DNA Cycle Sequencing System	Promega, Mannheim
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim

1.3 Oligonukleotidprimer und -sonden

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, Martinsried, bezogen.

Bezeichnung	Sequenz 5'® 3'	Verwendung	Literatur
			*
108S1F	TTCGCACCAAAGTTAATAAATTGA	NH, MS	1
1392S1R	CTTAGCCAACTCGTGAGCCACGCT	NH	1
1819S1F	GTGAGTTTTACGGAATACGTG	MS	*
1854S1R	ATTTCGATATTATCTTCACGTATTCCG	PE	1
2024S1R	AAAAAATTCGGCATAAATTGGACT	NH, MS	1
2211S1F	ACTACTGAGAGCGGTTTAAGAT	NH	1
2890S1R	GGAGCTTTTGCGATAACTTTTC	NH	1
3821S1F	GATAGCCACCGCTATCGACCC	NH, MS	1
4817S1F	GAGTACAAGATCTCCTAAGATTGG	NH	1
4977S1F	AGTGGAATTCCAAATACTGCTCCAATTACA	PKL	*
5034S1F	TTAGACTTGAAACAAATAACGGATAAC	PE, IVT	1
5286S1R	AAAGGAATTCCGTTGTCATAAATAAG	PKL	*
5398S1F	GGAATTCTTAACCGTTTCTCTTTTGC	PKL	*
5432S1F	GCCTCTTCAATTGCCTGAGTTAGC	NH, PE, IVT	1
5547S1F	GACTCTGTTCTTGAGTTTGCA	NH, MS	1
5674S1R	ATTGGAATTCCATTAGTTCCAAAGTCTATT	PKL	*
5694S1F	GTGAAGGCATATGTTTGTGAAGTC	NH	1
5720S1R	CTAGAGTTCACAAACATATGCCTTC	NH, MS	1
6588S1R	TATCTTTCCATCCTGTGGTACTGC	PE	1
9024S1R	TCTACCGTTAACCTCTAGATATCC	NH	1
9012S1F	GGTTAACGGTAGACATTATCG	MS	*
9279S1R	TCTCAACTCTGGCTCTTGG	NH, MS	1
9459S1R	GATCAATAATCATATAATCTTTATGAGG	NH, PE	1
9910S1R	CTAGACCTTTCAATAGGCAAGGTC	NH	1
10469S1F	ATAAATTCATCTCCTACTTCTTTTCC	PE	1
10771S1F	TAGCATAGACATCCCGGCTTTTTC	NH	1
10964S1F	AGCAGATATGACAATTTAATAGTT	PKL	*
11173S1F	GCCAAAGGTACGCAAAATGG	NH	1
11276S1R	GAAATTCTGTTGGGCAACAGGAGC	NH, PE, MS, IVT, PKL	1
12500S1R	CTCTGCTACAAAATGTACATTTGCGGGAAC	NH	1

12738S1R	TCCACTTTTGTCCATGCTC	NH	1
13062S1F	TACCATATTCCCCATTCTTTAC	NH	1
15161S1F	ACTGATTCAACTCCAGCGTC	MS	*
15191S1F	GAAAATGCAGGGAAAGATTTTCTATTC	PE	1
15281S1R	TGGGCAAGAGAAAAGGACAGA	NH	1
15461S1F	GGTAAAGGGAGGTGGAGCT	NH, MS	1
15494S1R	TCTAGAATTTCTACCAGCTCCACC	PE	1
16548S1R	GAAATGATGTTCCGCATAGTG	MS	*
17108S1R	CTAGATATCCAATTAGTAAAGTTTTCC	PE	1
18160S1R	CTTCATAAGCTTTTTGCGGAG	NH, MS	1
19241S1F	AGCCGGCATTATTGACTTATCAAAC	NH, MS	1
20494S1R	AACATCTTTTAGATTTTGGAAACTACC	PE	1
20762S1R	AAAATGTAAATTGTGTTCCGGC	NH, MS	1
21278S1F	CAATATCCTTACACCGGGATGAG	NH	1
22668S1R	AGATTATCGATAGCTGAACTTCC	NH	1
23429S1F	ATCTAGATTTTCTCACAGCCT	NH, MS	1
24428S1F	AGAATTGAAGTTAAGGAATTTCCACC	PE	1
24852S1R	ATCTTATTTCTGTATTTGTCATGATCC	PE	1
26131S1R	GAGGATAATAATCTTCCCAAG	NH, MS	1
26381S1F	TACCGAGACCTCCAAAAATCA	NH, MS	1
26814S1F	ATAGATTTGGTCTTCTACTAATTCG	PE	1
27630S1F	CGGTACGGGATGTGAAAACAA	NH	1
28203S1F	AAATGTTAATCTACTTCTTGAAATGTAC	PE	1
29157S1F	TCCGACTGTATAGCCTGTACACA	MS	*
29772S1R	TTGACCAGAAATGGCAATAACA	NH, MS	1
30036S1F	TTGAAGGATAAATAAATTGACTAAATGC	PE	1
1702S2R	TTGACTTGCTTTTGCCTCTCA	NH	1
2331S2R	CCCACCACTCATATGTATCTGTGTA	NH	1
2783S2R	TAACCCCAACTGAAATGTTTACATT	NH	1
3146S2R	TCCTCTTGCTAAAGTCATAGCTAAT	NH	1
3510S2R	CATCTGGAATATATTGATAGCCCAT	NH	1
4192S2R	TGAAACATGCAAACTAGGAGCT	NH	1
4715S2R	CTCTCTACCAAATGCTTCTATTG	NH	1
5196S2F	CTTGTCGACCATAACCAAGATTGTATGT	NH	1
5681S2F	AGTTGGAGTTCCAGATTCAAG	NH	1
6307S2R	TCAGTAACTGGAGCTTTTGCA	NH	1
6871S2F	GGAGCTGACATACCTAGAACA	NH	1
9127S2R	ACATATGCCTCCACATTCAGA	NH	1
10016S2F	CCATGACGATACACAGTCAGA	NH	1
10980S2R	GCATAAGTTGGCGGTTCAAGTG	NH	1
12421S2R	CTTCTAAGTATCCTGTCACTC	NH	1
12583S2R	GCGTATGCGTCTAACATTAGT	NH	1
12931S2R	CGTGTTGTATTATTATGCCAAATCTCTGC	NH	1
13921S2F	TAGTATATAGTATACTATATACTTTCCGAG	NH	1
14231S2F	TGTTAGTGCTGTGTTGACACA	NH	1
14270S2R	AGGGCCAGTAATTCCATATTGTGTCAACAC	NH	1
14624S2F	TGCCACAAATTGGACATTTCATATCCTAATAG	NH	1
14654S2R	CTATTAGGATATGAATGTCCAATTTGTGGCA	NH	1
15264S2R	GTTAACCCGCTTACAATCCC	NH	1
16145S2F	TGGATTATCGGGAAGATCAAG	NH	1
18324S2R	CCAACCGGCGTTAAGTACGG	NH	1
18931S2F	AAAAGGCGGTGGAGCTGGTA	NH	1
21070S2R	TTCCCGCCTAATCCAATCTGG	NH	1
22946S2F	AGGAAATGCGGAAAGCGAGT	NH	1

24770S2R	GGTCTCATCCCGGTGTAAGG	NH	1
25021S2F	ATGGGCAATCAAACAGGTGG	NH	1
26180S2R	GCTAGATATGGCGTTGATG	NH	1
26771S2F	AAAGCTGAACTACCACAGTCA	NH	1
29080S2R	ATCTGTTCTTGGGAGACCGC	NH	1
29649S2F	CTATGTGTTAAATCGCCATTTT	NH	1
299554S2F	AGACAGGTTTGGTCTCTTTACTAAT	NH	1
30439S2F	TAAAGGAATGCATAGATCTCCATT	NH	1
31380S2F	GTACACATCCTTCCTGTGTCA	NH	1
31841S2R	GCTAAGGCTGTTGATCAAATG	NH	1
32194S2F	TGCTAATTCAACTAATTGTCGATAATCTTC	NH	1
32724S2F	GACAACTTTTACACCGATTTT	NH	1
33137S2F	ATTCCGTAAATTCGCAAGTT	NH	1
33675S2F	CAGTACCTGCTATATATCTTCCTCCGC	NH	1
34138S2F	ACCCTTCCTGGCTAACTCATGAGTTA	NH	1
ORF56 F	GGAATTCCATATGCAAACTCAAGAACAGAG	GKL	*
ORF56R	GGATCCCTCGAGTTAACCGTTTCTCTTTTGCA	GKL	*
IR 56 F	ATGTCTTAGCAATTTAGCTAGCTTATGGAA	GS	*
IR 56 R	TTCCATAAGCTAGCTAAATTGCTAAGACAT	GS	*
Pro209 F	TAATAAGTAACTGACTAAAAT	GS	*
Pro209 R	ATTTTAGTCAGTTACTTATTA	GS	*
Pro486 F	TTATTGATTTAATAAATGAATCAAAAA	GS	*
Pro486 R	TTTTTGATTCATTTAATGAATCAAAAA	GS	*
T7Promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	IVT	*
T6 PromF	GATCGAATTCGATTGGAATCGAAACGGTCAC	PKL	2
T6 Prom R	GATCCAAGCTTCTTCTTCTTTTCGGGTTTGGG	PKL	2
Bio 5679S1R	Biotin-ATTGAATTAGTTCCAAAGTCTATTAGCG	PA	*
Bio 10964S1F	Biotin-AGCAGATATGACAATTTAATAGTT	PA	*
Bio 5367S1R	Biotin-TTCTCAACTAATTCTTAAACCAATATA	PA	*
Bio T7Promoter	Biotin-TAATACGACTCACTATAGGG	PA	*
T6 revers	TGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTC	PA	*
5'SSo0048	GGAATTCCTATGTCTGAAACCCAATTAA	GKL	*
3'SSo0048	GGATCCCTCGAGTTACAATGGCTTGAATTCCT	GKL	*

NH = Northern Hybridisierung; PKL = Promotorklonierung; PA = Promotoraffinitätsreinigung; MS = Manuelle Sequenzierung; IVT = *In vitro*-Transkription; GKL = Genklonierung; PE = Primer Extension; GS = Gelshift; S1 = SIRV1; S2 = SIRV2; Literatur: ¹Kessler *et al.*, 2004; ²Qureshi *et al.*, 1997, *unveröffentlicht.

2. Verwendete Organismen und Viren

ORGANISMUS/VIRUS	KULTURENSAMMLUNG	LITERATUR
„ <i>Sulfolobus islandicus</i> “ REN2H1	BBR 48/1/1	Zillig <i>et al.</i> , 1994
„ <i>Sulfolobus islandicus</i> “ LAL14/1	BBR 48/1/2	Zillig <i>et al.</i> , 1998
<i>Escherichia coli</i> XI 10 Gold™ ¹	-	-
<i>Escherichia coli</i> Rosetta™ ²	-	-
<i>Escherichia coli</i> EZ ³	-	-
SIRV1	-	Zillig <i>et al.</i> , 1994
SIRV2	-	Zillig <i>et al.</i> , 1998

BBR: Bakterienbank Regensburg. Bezugsquellen: ¹ Stratagene, La Jolla, USA; ² Novagene, Madison, USA; ³ Qiagen, Hilden

3. Verwendete Kulturmedien und Kulturbedingungen

3.1 „*Sulfolobus islandicus*“-Medium (SI-Medium; modifiziert nach Allen, 1959 und Brock, 1972)

(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 g
K ₂ HPO ₄ × 3 H ₂ O	0,5 g
KCl	0,1 g
Glycin	0,7 g
MnCl ₂ × 4H ₂ O, 1%ige (w/v) Lösung	90 µl
Na ₂ B ₄ O ₇ × 10 H ₂ O, 1%ige (w/v) Lösung	224 µl
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O, 1%ige (w/v) Lösung	11 µl
CuCl ₂ × 2 H ₂ O, 1%ige (w/v) Lösung	2,5 µl
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O, 1%ige (w/v) Lösung	1,5 µl
VO ₂ SO ₄ × 5 H ₂ O, 1%ige (w/v) Lösung	1,5 µl
CoSO ₄ × 7 H ₂ O, 1%ige (w/v) Lösung	0,5 µl
NiSO ₄ × 6 H ₂ O, 1%ige (w/v) Lösung	0,5 µl
Metall-Lösung	1,0 ml
pH 3,5 mit 25%iger H ₂ SO ₄	
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Dem Medium wurden 0,1% (w/v) Trypton, 0,1% (w/v) Hefeextrakt und 0,2% (w/v) Saccharose aus 10%igen Stammlösungen zugesetzt. Die Inkubation erfolgte aerob bei 80°C in Glycerinbadschüttlern (GYROTORY™, G76, New Brunswick Scientific, New Brunswick, USA). Bis zu einem maximalen Kulturvolumen von 500 ml wurden dazu Erlenmeyerkolben mit verlängertem Schliffaufsatz, die mit Alukappen verschlossen wurden, verwendet.

<u>Metall-Lösung:</u>	Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	70,8 g
	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	203,3 g
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Zur Herstellung von Gelriteplatten wurden 6 g Gelrite in 1 l sterilem SI-Medium unter Rühren gelöst, für ca. 10 min gekocht und dann zügig zu 20 ml Portionen in Plastikpetrischalen gegossen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

3.2 Luria-Bertani-Medium (LB-Medium; Miller, 1972)

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
pH 7,5 mit 2N NaOH	
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Zur Herstellung von festem Nährmedium wurde zusätzlich 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

Nach Bedarf wurde dem Medium Antibiotikum zugegeben:

Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml
Kanamycin	40 µg/ml

Für Blau/Weiß-Screening wurden auf die Platten zusätzlich 10 µl IPTG (100 mM) und 50 µl X-GAL (40 mg/ml, gelöst in Formamid) aufgebracht.

Anzuchten bis zu 10 ml Volumen wurden im Reagenzglas bei 37°C „gerollt“ (Tissue Culture Roller Drum, Modell TC7; New Brunswick Scientific, New Brunswick, USA). Größere Volumina wurden in zu 50% gefüllten Erlenmeyerkolben einem Horizontalschüttler (GYROTORY™, G76; New Brunswick Scientific, New Brunswick, USA) inkubiert.

4. Sterilisation

Medien, hitzeunempfindliche Medienzusätze, Puffer und Stammlösungen wurden für 20 min. bei 121°C und 200 kPa unter feuchter Hitze autoklaviert (SANOclav, Wolf, Geislingen). Hitzeempfindliche Substrate wurden über Cellulose-Acetat-Filter sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm, Millipore, Bedford, USA). Glasgeräte, Pipettenspitzen, Zentrifugenröhrchen u. ä., sowie Diethylpyrocarbonat behandelte Lösungen und H₂O_{bidest}, das zur Herstellung von Stammlösungen für RNA-Arbeiten verwendet wurde, wurden für 40 min. bei 121°C autoklaviert (s.o.). Zur Beseitigung

von DNA-Rückständen wurden Zentrifugenröhrchen sowie Glasgefäße vor dem Autoklavieren in 6%-iger (v/v) Chlorbleichlauge eingelegt und anschließend mit Reinwasser gespült.

5. Mikroskopie

5.1 Phasenkontrastmikroskopie

Die Mikroskopie im Phasenkontrast erfolgte an einem Mikroskop der Firma Zeiss (Jena), das mit einem Phasenkontrastobjektiv (NEOFLUAR 100, PH3, Zeiss) ausgestattet war.

5.2 Bestimmung von Zellzahlen

Die Bestimmung von Gesamtzellzahlen erfolgte mit einer Thoma-Zählkammer (Brand, Wertheim; Kammervolumen: 0,02 mm x 0,0025 mm² pro Kleinstquadrat) und wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Gesamtzellzahl} / \text{ml} = \text{Anzahl der Zellen} / \text{Kleinstquadrat} \times 2 \times 10^7$$

oder erfolgte näherungsweise durch Bestimmung der OD₆₀₀ in einem Spektralphotometer (DU[®] 640 Spectrophotometer, Beckman Instruments, Fullerton, USA).

6. Virusvermehrung und -präparation

6.1 Tropf-Test

In einem 100 ml Becherglas wurden 60 mg Gelrite in 20 ml SI-Medium (s. II.3.1) unter Rühren bei 95°C gelöst und in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 80°C gehalten. Im 80°C Wasserbad wurden in kleinen Reagenzgläsern je 2 ml der Gelrite-Lösung mit jeweils 150 µl einer gut gewachsenen *Sulfolobus*-Kultur (OD₆₀₀ ca. 0,2; DU[®] 640 Spectrophotometer, Beckman Instruments, Fullerton, USA) gemischt und als „soft-layer“ auf Gelrite-Platten, die auf 80°C vorgewärmt wurden,

gegossen. Nach dem Erkalten wurde an verschiedenen Stellen jeweils 1 µl einer Suspension des entsprechenden Virus aufgetropft. Nach dem Trocknen wurden die Platten in feuchter Atmosphäre, in einem mit Frischhaltefolie abgedeckten und mit Glasdeckel verschlossenen Plexiglasbehälter, bei 80°C in einem Heißluftinkubator (kelvitron[®]t, Heraeus, Osterode) bebrütet. Nach zwei Tagen Inkubation wurden an den Stellen, an denen das Virus aufgetropft wurde, Hemmhöfe sichtbar. Diese wurden mit einem sterilen Spatel ausgestochen und in 25 ml SI-Medium transferiert.

6.2 Virusvermehrung

Sobald die virusinfizierten Zellen (s. II.6.1) zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 herangewachsen waren, wurden sie zu einer gut gewachsenen 500 ml Kultur (OD₆₀₀ ca. 0,2) nicht infizierter Wirtszellen gegeben. Diese Ansätze wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 inkubiert.

6.3 Viruspräparation

Zur Ernte wurden die Zellen für 30 min. bei 8000 UpM und 4°C abzentrifugiert (SORVALL[®] RC 5C PLUS, GSA-Rotor). Der klare, virushaltige Überstand wurde gesammelt und ÜN bei 4°C mit Polyethylenglykol (10,5 g/100 ml Überstand) und Natriumchlorid (5,8 g/100 ml Überstand) präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation für 40 min. bei 12000 UpM und 4°C gesammelt (SORVALL[®] RC 5C PLUS, GS3-Rotor). Das Pellet wurde in wenig (ca. 2 ml pro Zentrifugenbecher und Pellet) TA-Puffer (Tris/Acetate, pH 6,0, 20 mM) resuspendiert und nach Zugabe von 0,45 g CsCl/ml Lösung für 48 h bei 48000 UpM bandiert (Optima[™] LE-80K Ultrazentrifuge, Beckman Instruments, Fullerton, USA; Rotor SW.50.1). Nach der Ultrazentrifugation waren zwei Banden sichtbar, die getrennt gezapft und im Kühlschrank gelagert wurden. Die obere Bande enthielt zusätzlich Geißeln, die während der Präparation abbrachen, die untere Bande den Großteil an Viruspartikeln.

6.4 Plaque-Test

Zur Bestimmung des Virustiters ("Plaque forming units", p.f.u.) wurde ein Plaque-Test durchgeführt. Dazu wurde zunächst vom Viruspräparat eine Verdünnungsreihe angelegt. (unverdünnt, 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} , 10^{-13}). Dann wurde wie beim Tropftest (s. II.6.1) auf Gelrite-Platten eine zweite Schicht, bestehend aus je 2 ml Gelrite-SI-Medium, 150 μ l *Sulfolobus*-Kultur (OD_{600} ca. 0,2) und jeweils 100 μ l der entsprechenden Virusverdünnung, gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Platten in feuchter Atmosphäre (s. II.6.1) bei 80°C im Heißluftinkubator (kelvitron[®], Heraeus Osterode) inkubiert. Nach zwei Tagen Inkubation wurden auf den Platten Plaques (bzw. Hemmhöfe) sichtbar, die dann ausgezählt wurden. Daraus konnte die Zahl der p.f.u. nach folgender Rechnung bestimmt werden:

$$\text{Anzahl der Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10 = \text{p.f.u.} / \text{ml}$$

7. Molekulargenetische Methoden

7.1 Isolierung von Nukleinsäuren

7.1.1 Puffer und Lösungen

TA-Puffer: Tris/Acetat, pH 6,0 20 mM

Aqua Phenol Aqua Phenol[™] (Appligene) wurde mit 0,1% (v/v) Hydroxychinolin versetzt und nach Angaben des Herstellers mit der pH Maker[™] Lösung (pH 7,5) ausgeschüttelt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C in einer dunklen Flasche.

7.1.2 DNA-Isolierung aus Viren

1 ml über CsCl-Bandierung gereinigtes Viruspräparat (s. II.6.3) wurde zur Verringerung der Ionenstärke für 2 h bei Raumtemperatur gegen TA-Puffer dialysiert. Um die Proteine der Viruspartikel aus ihrem Verband zu lösen, wurde der Viruslösung 1% (v/v) Lauryl-Sarcosin-Lösung zugesetzt und 30 min. bei

Raumtemperatur in einem Über-Kopf-Schüttler (Eigenkonstruktion, mechanische Werkstatt, Universität Regensburg) inkubiert. Nach Zugabe von 1 Vol Phenol wurde für weitere 30 min. rotiert. Zur Trennung der Phasen wurde für 5 min. bei 13000 UpM (Biofuge pico, Heraeus, Osterode) zentrifugiert. Um an Protein gebundene DNA nicht zu verlieren, wurde die wässrige Phase und die Interphase in ein frisches ERG überführt, zweimal mit 1 Vol Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:24:1, v/v/v) ausgeschüttelt und schließlich mit 1 Vol Chloroform ausgeschüttelt. Der wässrige Überstand wurde abgenommen, erneut mit 1 Vol Chloroform extrahiert und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von Natriumacetat (pH 5,2) zu einer Konzentration von 0,3 M wurde die DNA mit 0,8 Vol kaltem Isopropanol für 1 h bei -20°C präzipitiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 13000 UpM (Labofuge© 400R, Heraeus, Osterode) und 4°C wurde das Pellet 2x mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, schließlich an Luft getrocknet und in 10-30 µl H₂O_{bidest} resuspendiert.

7.1.3 RNA-Isolierung aus virusinfizierten Zellen

"*Sulfolobus islandicus*" REN2H1 oder LAL14/1 Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 (1×10^8 Zellen/ml) wachsen gelassen und mit SIRV1 oder SIRV2 mit einer m.o.i. von 5 infiziert. Für die RNA-Präparation zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion wurden 20 ml Aliquots 0 min., 30 min., 60 min., 120 min., 180 min. und 240 min. nach der Infektion entnommen und aufgearbeitet. Dazu wurden die Zellen für 15 min. bei 4500 UpM und 4°C abzentrifugiert (Labofuge© 400R, Heraeus, Osterode) und daraus die Gesamt-RNA unter Verwendung des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen, Hilden, nach Angaben des Herstellers isoliert. Die hierzu erforderlich vollständige Homogenisierung der Proben wurde durch Zentrifugation für 2 min bei 13000 UpM durch ein QIAshredder™ Säulchen (Qiagen, Hilden) erreicht. Zur Entfernung etwaiger DNA Kontaminationen wurde die RNA während des Reinigungsprozesses direkt auf der Säule mit dafür vorgesehener DNase I (Qiagen) nach Angaben des Herstellers behandelt.

7.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

7.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen wurde mit einem Spektralphotometer DU®640 (Beckman Instruments, Fullerton, USA) in einer 100 µl Quarzküvette die optische Dichte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt. Aus der Absorption bei 260 nm wurde die Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration} = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{spezifische Konzentration}$$

Aus dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} konnte die Reinheit der Nukleinsäuren abgeschätzt werden.

Reine Nukleinsäure	Spez. Konz. bei $OD_{260}=1$	OD_{260}/OD_{280}
genomische DNA	50 µg/ml	1,8
DNA-Oligonukleotide	20 µg/ml	1,8
Plasmid-DNA	20 µg/ml	1,8-2,0
RNA	40 µg/ml	1,8-2,0

Für die Konzentrationsbestimmung wurde DNA in $H_2O_{bidest.}$ RNA in DEPC- H_2O verdünnt, für die Abschätzung der Reinheit wurden die Nukleinsäuren in TE-Puffer verdünnt.

7.2.2 Konzentrationsbestimmung mittels Ethidiumbromidplatten

Zur Abschätzung geringer DNA-Konzentrationen wurde auf eine Ethidiumbromidplatte (Platten aus 1% (w/v) Agarose in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA), die 5 µg/ml Ethidiumbromid enthielten) λ -DNA-Mengenstandards bekannter Konzentration (6, 12, 25, 50, 100 ng/µl) aufgetragen. Parallel dazu wurde 1 µl der zu bestimmenden DNA Lösung aufgetragen und nach 10 min. Einwirkzeit die Fluoreszenzstärken im UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) miteinander verglichen und daraus die DNA Konzentration abgeschätzt.

7.3 Gelelektrophorese

7.3.1 Puffer und Lösungen

<u>TAE-Puffer</u>	Tris/Eisessig, pH 8,3 Na ₂ -EDTA	40 mM 1 mM
<u>1x TBE-Puffer</u>	Tris Borsäure EDTA	89 mM 89 mM 2 mM
<u>MOPS-Puffer</u>	3-Morpholinopropansulfonsäure Natriumacetat Na ₂ -EDTA	20 mM 5 mM 1 mM
<u>1x Laufpuffer</u>	Tris Glycin H ₂ O _{bidest}	3,0 g 14,4 g ad 1000 ml
<u>DNA-Auftragspuffer</u>	Bromphenolblau Xylencyanol Glycerin TAE-Puffer	0,05 g 0,05 g 500 ml ad 20 ml
<u>RNA-Auftragspuffer</u> (2x Loading Dye Solution)	Formamid SDS Bromphenolblau Xylencyanol Ethidiumbromid Na ₂ -EDTA	95% (w/v) 0,025% (w/v) 0,025% (w/v) 0,025% (w/v) 0,025% (w/v) 0,5 mM
<u>Formamid-Auftragspuffer</u>	Formamid Xylencyanol Bromphenolblau Na ₂ -EDTA	10 ml 0,1% (w/v) 0,1% (w/v) 10 mM

7.3.2 Native Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von PCR-Produkten, Plasmiden und genomischer DNA erfolgte auf 0,8-1,2%igen (w/v) Agarosegelen. Dazu wurde die Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50°C mit 0,01% Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) versetzt und in eine horizontale Gelkammer gegossen.

Gele, auf denen restriktionsverdaute, genomische DNA aufgetrennt wurde, wurden mit SeaKem ME Agarose hergestellt und ohne Zugabe von Ethidiumbromid gegossen. Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele für 30 min. in einem Ethidiumbromidfärbebad (0,5 mg in 500 ml TAE-Puffer) gefärbt und anschließend für 30 min. in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ entfärbt.

Die Proben wurden vor dem Auftrag mit $\frac{1}{10}$ Vol Auftragspuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zusammen mit entsprechenden DNA-Größenstandards im Fall kleiner Agarosegele (Volumen 35 ml) bei 90 V für 35 Minuten, im Fall großer Gele (Volumen 280 ml) bei 50 V für 12-15 h in TAE-Puffer.

Die Auftrennung der Banden wurde auf einem UV-Leuchtschirm ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht und mit dem EasyStore Imaging System (Herolab, Wiesloch) dokumentiert.

7.3.3 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von RNA erfolgte auf einem 1,2%igem (w/v) Agarose-Formaldehydgel. Dazu wurden 2,4 g SeaKem LE Agarose in 200 ml 1x MOPS aufgekocht. Nach Abkühlung der Agaroselösung auf eine Temperatur von 60°C , wurden 3,6 ml 37% (v/v) Formaldehyd zugesetzt, und das Gel in eine horizontale Elektrophoreseapparatur (12,5 x 19,5 cm) gegossen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS-Puffer für 2,5 h bei einer Spannung von 120 V. Aufgetragen wurden jeweils 5 μg RNA, die zuvor mit 5 μl Auftragspuffer (MBI Fermentas) versetzt wurden. Als Marker wurden 5 μg RNA-Standard (Gibco, Life Technologies) aufgetragen. Da der RNA-Auftragspuffer bereits Ethidiumbromid enthielt, musste dem Gel dieses nicht zugesetzt werden und die RNA konnte nach erfolgter Elektrophorese auf einem UV-Leuchtschirm sichtbar gemacht werden.

7.3.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse von Oligonukleotiden, sehr kleinen DNA Fragmente ($<150 \text{ bp}$), sowie für Gel-Verzögerungstests wurden native 5-10%ige Polyacrylamidgele verwendet. Mit Ausnahme der Gel-Verzögerungstests wurde den Proben wie bei den nativen Agarosegelen $\frac{1}{10}$ Volumen DNA-Auftragspuffer zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte nach 20 minütigem Vorlauf der Gele in 1x TBE oder 1x Laufpuffer in einer

vertikalen Elektrophoreseapparatur (20 × 20 cm; 1,5 mm Gel-Dicke) bei 19 Watt bis die Bromphenolblaubande bis zu $\frac{3}{4}$ durch das Gel gewandert ist, bzw. für die Gel-Verzögerungstest für 2 h bei 170 V. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel 2 min. in Fixiererlösung (10% (v/v) Eisessig, 10% (v/v) Methanol) gelegt, auf ein Stück 3 MM Whatman Papier transferiert, mit Frischhaltefolie abgedeckt und unter Vakuum für 30 min. bei 80°C in einer Geltrocknungs-Apparatur (DryGel Sr. SE1160, Hoefer, San Francisco, USA) getrocknet. Die Banden wurden schließlich durch Autoradiographie (s. II.7.6) sichtbar gemacht.

7.3.5 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese zur Analyse von "Primer Extension" Produkten, Sequenzreaktionen, sowie DNase I Footprints wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden 0,4 mm dicke, 8%ige Polyacrylamidgele, welche 7 M Harnstoff enthielten, gegossen. Vor dem Beladen der Gele fand ein Vorlauf von 20-30 min. statt. Die Proben wurden 1:1 mit Formamidaufragspuffer versetzt, für 5 min. bei 95°C aufgekocht, kurz auf Eis abgekühlt und schließlich auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1× TBE für ca. 40 min. bei 19 Watt für 20 × 20 cm Gele und für ca. 3 h bei 50 Watt für 40 × 50 cm Gele. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel 2 min. in Fixiererlösung (10% (v/v) Essigsäure, 10% (v/v) Methanol) gelegt, auf ein Stück 3 MM Whatman Papier transferiert, mit Frischhaltefolie abgedeckt und unter Vakuum für 30 min. bei 80°C in einer Geltrocknungs-Apparatur (DryGel Sr. SE1160, Hoefer, San Francisco, USA) getrocknet.

7.4 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus nativen Agarosegelen wurde nach entsprechender elektrophoretischer Auftrennung die gewünschte Bande unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aus dem Agaroseblöckchen mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits oder des QIAEX II Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

7.5 Reinigung von DNA aus nativen Polyacrylamidgelen

Zur Isolierung von DNA aus nativen Polyacrylamidgelen wurde im Falle nicht radioaktiver Proben die DNA mittels UV-Schattierung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel nach erfolgter Elektrophorese in Frischhaltefolie eingewickelt und auf eine ^{32}P Verstärkerfolie (Kodak, 3M Trimax 16B) gelegt. Durch Bestrahlung mit UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) wurde die DNA als dunkel kontrastierte Bande im Gel sichtbar und konnte mit einer sterilen Rasierklinge aus dem Gel ausgeschnitten werden. Die ausgeschnittene Bande wurde in ein 0,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt, in welches zuvor im unteren Drittel mit einer Kanüle (Sterican[®], 0,60 x 30 mm, B. Braun, Melsungen) ringsum Löcher gestochen wurden. Das Gefäß wurde geschlossen und in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben. Durch Zentrifugation für 10 min. bei 13000 UpM in einer Tischzentrifuge (Biofuge Pico) wurde das Gelstück zerkleinert und in das 1,5 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert. Die Gelstücke wurden über Nacht bei Raumtemperatur in einem Überkopfschüttler in 400 μl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA) äquilibriert. Nach Zentrifugation für 15 min. bei 13000 UpM (Biofuge Pico) und RT wurde der Überstand abgenommen und die darin enthaltene DNA durch Zugabe von 0,3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Vol eiskaltem Ethanol_{absolut} für mindestens 1 h bei -20°C präzipitiert. Nach anschließender Zentrifugation für 30 min. bei 13000 UpM und 4°C wurde das Pellet einmal in 70% (v/v) Ethanol gewaschen, schließlich an Luft getrocknet und in 10 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgenommen.

Im Falle radioaktiv markierter Proben wurde das Gel ebenfalls in Frischhaltefolie gewickelt und mit Tesafilm in definierter Position in einer Röntgenfilmkassette fixiert. Durch 5-minütiges Auflegen eines Röntgenfilms (KODAK X-Omat LS (XLS)) wurde die DNA Bande auf diesem sichtbar. Aus dem Röntgenfilm konnte eine Schablone geschnitten werden, die erneut mit dem Gel zur Deckung gebracht werden konnte, um die Position der DNA Bande auf dem in Folie eingewickelten Gel anzuzeichnen. Schließlich wurde die Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA wie bereits beschrieben aus dem Gel eluiert.

7.6 Autoradiographie

Die Detektion radioaktiv markierter DNA und RNA erfolgte mittels Autoradiographie. Für die Detektion der Northern-Hybridisierungs-Signale wurden KODAK BioMAX MS Filme in Kombination mit einem BioMax MS Intensifying Screen verwendet. Für alle anderen Anwendung wurden KODAK X-Omat LS (XLS) Filme in Kombination mit einem BioMax MS Intensifying Screen verwendet. Die Exposition erfolgte bei -70°C je nach Intensität des Signals und Sensitivität des Röntgenfilms, zwischen 4 h und 4 Tagen. Die Filme wurden manuell entwickelt (Röntgen Entwickler- und Fixierkonzentrat, Adefo Chemie GmbH, Nürnberg). Im Fall einer Quantifizierung von erhaltenen Banden erfolgte diese densitometrisch unter Verwendung eines Fuji FLA-5000 Image Readers (Fuji-Film, Tokyo, Japan) und zugehörigem AIDA Image Analyzer v.3.28 Computerprogramm.

7.7 Restriktionshydrolyse

Die Hydrolyse doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte für ein bis drei Stunden bei 37°C in dem vom Hersteller mitgelieferten bzw. bei Doppel- oder Mehrfachverdau in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer.

7.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR; Saiki *et al.*, 1985; Saiki *et al.*, 1988)

7.8.1 Standard-PCR

Alle PCR Reaktionen wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen in einem Thermocycler (Progene-02, Thermo-DUX, Wertheim oder GeneAmp[®] PCR System 9700, Perkin Elmer Cetus, Norfolk, USA) als Hot-Start-PCR-Reaktionen durchgeführt. PCR-Reaktionen, bei denen radioaktiv markierte Primer verwendet wurden, wurden in einem Mastercycler[®] personal Thermocycler der Firma Eppendorf, Hamburg durchgeführt. Die Ansätze wurden mit kontaminationsfreien Pipettenspitzen mit Filtereinsatz pipettiert.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:

10x PCR-Puffer (incl. MgCl ₂ , 15 mM)	5 µl
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	4 µl
F-Primer (25 ng/µl)	2 µl
R-Primer (25 ng/µl)	2 µl
DNA (5 ng/µl)	2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
H ₂ O _{bidest}	34,75 µl

Reaktionsbedingungen Progene 02, Thermo-DUX:

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur
1	5 min	94°C
35	1 min	94°C
	1 min	60°C
	2 min	72°C
1	10 min	72°C
1	8	4°C

Reaktionsbedingungen GeneAmp® PCR System 9700, Perkin Elmer:

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur
1	1 min 30 s	96°C
10	30 s	96°C
	30 s	60°C
	1 min	72°C
25	20 s	94°C
	30 s	60°C
	1 min	72°C
1	10 min	72°C
1	8	4°C

Reaktionsbedingungen Mastercycler® personal, Eppendorf:

Zyklenzahl	Zeit	Temperatur
1	1 min	96°C
20	30 s	96°C
	30 s	50°C
	1 min	72°C
1	8	4°C

Zu jedem Ansatz wurde eine entsprechende Negativkontrolle durchgeführt.

Zur Überprüfung der PCR-Amplifikationen wurden jeweils 9 µl PCR-Ansatz mit 1 µl DNA-Auftragspuffer versetzt und auf einem 15%igem (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. II.7.3.2).

7.8.2 Kolonie-PCR

Zur Identifikation positiver Transformanten nach Klonierungsexperimenten wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierbei wurden anstelle isolierter DNA ganze Zellen als Template in die PCR-Reaktion eingesetzt.

7.8.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um nicht inkorporierte Primer und Nukleotide sowie Taq-Polymerase aus dem PCR-Ansatz wieder zu entfernen, wurde der QIAquick PCR-Purification Kit der Firma Qiagen, Hilden verwendet.

7.8.4 Ligation von PCR-Produkten

Die Ligation gereinigter PCR-Produkte erfolgte entweder in dem Vektor pDRIVE (Qiagen, Hilden) über die durch die Taq-Polymerase erzeugten 3'-A-Überhänge und den im Vektor vorhandenen komplementären 5'-U-Überhängen, unter Verwendung des QIAGEN®PCR Clonig^{plus}Kit nach Angaben des Herstellers, oder für die Erstellung von Expressionskonstrukten in entsprechenden Expressionsvektoren mit Hilfe des Rapid DNA-Ligation Kits der Firma Roche, Mannheim, nach Herstellerprotokoll.

7.8.5 Einführung von Restriktionsschnittstellen

Zur Konstruktion von Expressionsklonen mussten DNA-Fragmente in einem genau definierten Leseraster in die entsprechenden Expressionsvektoren eingebracht werden. Dazu wurden am Beginn und am Ende des proteinkodierenden Gens zusätzliche Restriktionsschnittstellen eingefügt, indem die PCR des zu klonierenden Gens mit Primern, welche die gewünschten Restriktionsschnittstellen im

entsprechenden Leseraster enthielten, durchgeführt wurde. Zur DNA-Synthese wurde Pfu-Polymerase verwendet, da diese über einen Korrekturlesemechanismus verfügt. Um trotzdem bei der Genamplifikation mögliche entstandene Fehler auszuschließen, wurden die Expressionskonstrukte zur Kontrolle sequenziert.

7.8.6 Biotinylierung von DNA-Fragmenten

Um Biotin-markierte DNA-Fragmente zu erhalten, wurden diese mit biotinylierten Primern (Metabion, Martinsried) amplifiziert.

7.8.7 ^{32}P -Markierung von DNA-Fragmenten

^{32}P -markierte DNA-Fragmente wurden über PCR-Reaktionen erhalten, bei denen einer der beiden verwendeten Primer zuvor mittels T4 Polynukleotidkinase am 5' Ende mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ radioaktiv markiert wurde (s. II.7.11.2).

7.9 Klonierung und Plasmidpräparation

7.9.1 Puffer und Lösungen

<u>TFB1-Puffer</u>	KAc	1,473 g
	$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	4,95 g
	RbCl	6,046 g
	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,74 g
	Glycerin	75 ml
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 500 ml
	pH 5,2 mit 50%iger Essigsäure	

<u>TFB2-Puffer</u>	MOPS	1,075 g
	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	5,5 g
	RbCl	0,605 g
	Glycerin	75 ml
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 500 ml
	pH 7,0 mit H_2SO_4	

7.9.2 Herstellung kompetenter Zellen

E. coli Zellen wurden mit Rubidiumchlorid für die Aufnahme von DNA kompetent gemacht (Hanahan, 1983). Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit der gewünschten *E. coli* Kultur beimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf Eis abgekühlt und die Zellen bei 2500 UpM für 5 min. in 50 ml Falcontubes abzentrifugiert (Labofuge[®] 400R, Heraeus, Osterode). Die Zellen wurden in insgesamt 30 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und für 120 min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min. bei 2500 UpM und 4°C wurden die Zellen behutsam in insgesamt 4 ml TFB2-Puffer resuspendiert. Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurde den Zellen 60 µl DMSO zugesetzt. Die Zellen wurden zu 100 µl Aliquots bei -70°C gelagert. Die vollständige Transformationseffizienz der Zellen wurde erst nach dem Einfrieren oder durch Übernacht-Inkubation auf Eis erreicht.

7.9.3 Transformation von *E. coli*

100 µl kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 5-15 µl Ligationsansatz (s. II.7.8.4) vermischt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 45 s ein Hitzeschock bei 42°C, wonach die Zellen nochmals für eine min. auf Eis inkubiert wurden. Anschließend wurden sie mit 1 ml LB-Medium versetzt und zur Regeneration für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die nun transformierten Zellen wurden 1 min. bei 13000 UpM in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet wurde in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf eine LB-Platte mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Zur Selektion pDRIVE transformierter Zellen wurde Ampicillin (100 µg/ml) und gegebenenfalls zusätzliches Blau/Weiß-Screening (s. II.3.2) verwendet. Zur Selektion mit Expressionskonstrukten transformierter Zellen wurde in der Regel Kanamycin (40 µg/µl) verwendet. Zur Verifizierung positiver Transformanden wurden diese mittels Kolonie-PCR überprüft (s. II.7.8.2), parallel dazu auf Platte gesichert und für die Plasmidpräparation in 10 ml LB-Medium mit entsprechenden Selektionsmarkern angeimpft und über Nacht bei 37°C rollend inkubiert.

7.9.4 Plasmidpräparation

Zur Plasmidisolierung positiver *E. coli* Klone wurden 4 ml Übernacht-Kultur sukzessive in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß zentrifugiert (1 min., 13000 UpM, Biofuge Pico). Die Plasmidisolierung erfolgte unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Elution von den Zentrifugationssäulchen erfolgte mit 50 µl sterilem H₂O_{bidest.}

7.10 Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA

Sequenzierungen wurden von der Firma GENEART (Regensburg) unter Verwendung eines ABI Sequenziergerätes nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Sequenzierungsansätze enthielten 200-500 ng Plasmid DNA bzw. 20 ng PCR-Produkt/100 bp, sowie 10 µM Primer in einem Reaktionsvolumen von 8 µl.

7.11 Nachweis virusspezifischer Transkripte in Gesamt-RNA aus virusinfizierten Zellen

7.11.1 Herstellung ³²P-markierter dsDNA-Sonden

Die über PCR gewonnenen Virus DNA-Fragmente wurden mittels „Random Priming“ mit ³²P markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983; Feinberg und Vogelstein, 1984). Dazu wurde das Megaprime™ DNA Labelling System der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) eingesetzt und nach dem Standard Megaprime Protokoll gearbeitet. Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

DNA (5 ng/µl)	5 µl
dTTP	4 µl
dGTP	4 µl
dCTP	4 µl
Labelling Puffer	10 µl
Primerlösung	5 µl
H ₂ O	11 µl
[α ³² P] dATP	5 µl
Klenow-Fragment	2 µl

Der Ansatz wurde für 10 min. bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 5 µl 0,2 M EDTA zugesetzt. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide

erfolgte mit Probe QuantTM G-50 Micro Columns (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerprotokoll.

7.11.2 Herstellung ³²P-markierter Oligonukleotidsonden und Primer

Oligonukleotide wurden mit Hilfe von T4-Polynukleotidkinase am 5'Ende mit ³²P markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983).

Reaktionsansatz:

Oligonukleotid	100 ng
10x Kinase-Puffer	2 µl
[γ ³² P] ATP (3000-6000 Ci/mmol)	3 µl
T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)	1 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

Der Ansatz wurde für 30 min. bei 37°C inkubiert und zur Inaktivierung anschließend für 5 min. bei 95°C. Die Abtrennung von nicht inkorporiertem [γ ³²P] ATP erfolgte mit Probe QuantTM G-50 Micro Columns (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerprotokoll. Für die Markierung von Oligonukleotiden für den Einsatz in DNase I Footprinting Experimenten wurde das Volumen des Ansatzes vor der Aufreinigung nicht wie im Herstellerprotokoll angegeben auf 50 µl erhöht.

7.11.3 Northern Blotting

Puffer und Lösungen

<u>20x SSC</u>	Na ₃ -Citrat	0,3 M
	NaCl	3 M

<u>Denaturierungslösung</u>	NaOH	0,5 N
-----------------------------	------	-------

Durchführung

Nach Elektrophorese der RNA, wie unter II.7.3.3 beschrieben, wurde das Gel für 30 min. in eine Denaturierungslösung gelegt, um den Transfer großer RNA-Moleküle zu

erleichtern. Nach kurzem Waschen in RNase-freiem Wasser wurde das Gel für 20 min. in 20× SSC äquiliibriert. Auf zwei zu ca. 1/3 mit 20× SSC gefüllte Plastikwannen wurde eine Glasplatte gelegt, über die die beiden Gefäße mit einer Brücke aus 3 MM Whatmanpapier, das zuvor in 20× SSC getränkt wurde, verbunden wurden. Darauf wurde das Gel mit der RNA-Seite nach oben gelegt und die Gelränder mit Parafilmstreifen abgedichtet, sodass der Transfer durch das Gel gewährleistet wird. Eine entsprechend zurechtgeschnittene Nylonmembran (Biodyne® B 0,45 µm, Pall) wurde kurz in DEPC-H₂O angefeuchtet, dann in 20× SSC äquiliibriert und auf das Gel gelegt. Auf die Nylonmembran folgten zwei Schichten in 20× SSC getränktes 3MM Whatman Papier und ein ca. 10 cm hoher Stapel Zellstofftücher. Der Aufbau wurde mit einer zweiten Glasplatte und ca. 250 g Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht. Nach erfolgtem Transfer wurde die RNA durch halbstündiges Backen bei 80°C (Wärmeschrank, Memmert, Schwabach) auf der Membran irreversibel fixiert. Die trockene Membran konnte bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

7.11.4 Hybridisierung mit radioaktiv markierten dsDNA-Sonden

Puffer und Lösungen

denaturierte DNA aus Heringssperma:

DNA aus Heringssperma (Boehringer) wurde in H₂O_{bidest} zu einer Konzentration von ca. 10 mg/ml gelöst und jeweils einmal mit Phenol und Phenol:Chloroform (1:1, v/v) ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde 12× zügig durch eine Spritze mit einer Kanüle (Sterican®, 0,60 x 30 mm, B. Braun, Melsungen) gepresst. Die gescherte DNA wurde dann mit 2 Vol eiskaltem Ethanol präzipitiert, abzentrifugiert und zu einer Konzentration von 10 mg/ml in H₂O_{bidest} gelöst. Die Lösung wurde für 10 min. aufgekocht, aliquotiert und bei –20°C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurde die DNA für 5 min. im kochenden Wasserbad denaturiert, auf Eis kurz abgekühlt und zur Vorhybridisierungs/Hybridisierungslösung gegeben.

Denhardt's (100x)

Ficoll 400	10 g
Polyvinylpyrrolidon	10 g
BSA	10 g
H ₂ O _{bidest}	ad 500 ml

<u>Vorhybridisierungs/ Hybridisierungslösung</u>	Formamid	50% (v/v)
	SSC	5x
	Denhardt`s	5x
	SDS	1% (w/v)
	denaturierte DNA aus Heringssperma (Zugabe unmittelbar vor Gebrauch)	100 µg/ml
<u>Waschpuffer 1</u>	SSC	0,2x
	SDS	0,1% (w/v)
<u>Waschpuffer 2</u>	SSC	2x

Durchführung

Die Nylonmembran wurde zunächst in 20 ml auf 42°C vorgewärmter Vorhybridisierungslösung in einem Hybridisierungsröhrchen (Biometra, Göttingen) für mindestens 2 h unter Rotation in einem Hybridisierungssofen (OV 5, Biometra Göttingen) bei 42°C vorinkubiert. Zur Hybridisierung wurde die dsDNA-Sonde für 5 min. bei 95°C denaturiert, auf Eis kurz abgekühlt und zur Vorhybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 42°C. Nach abgeschlossener Hybridisierung wurde die Membran in Waschpuffer 1 zunächst 2x für 5 min. bei Raumtemperatur, anschließend 2x 15 min. bei 60°C gewaschen. Zum Schluß wurde die Membran bei Raumtemperatur in Waschpuffer 2 geschwenkt.

7.11.5 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotidsonden

Puffer und Lösungen

denaturierte DNA aus Heringssperma (s. II.7.11.4)

Denhardt`s (100x) (s. II.7.11.4)

<u>Vorhybridisierungs/ Hybridisierungslösung</u>	SSC	5x
	Denhardt`s	5x
	Natriumphosphat, pH 6,5	0,05 M
	SDS	0,1% (w/v)
	denaturierte DNA aus Heringssperma	100 µg/ml
	(Zugabe unmittelbar vor Gebrauch)	

<u>Waschpuffer 1</u>	SSC SDS	1× 0,1% (w/v)
<u>Waschpuffer 2</u>	SSC	2×

Durchführung

Die Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden wurde analog Punkt II.7.11.4 durchgeführt. Die Sonde mußte jedoch vor Zugabe nicht denaturiert werden.

Gewaschen wurde zweimal in Waschpuffer 1 für 15 min. bei Raumtemperatur und zweimal für 20 min. bei 55°C, danach in Waschpuffer 2 bei RT.

7.12 Identifikation von Transkriptionsstartpunkten und Promotorregionen

Zur Identifikation der Transkriptionsstartpunkte wurden mittels „Primer Extension“ Analyse die 5´-Enden der Messenger RNAs bestimmt. Dazu wird mit einem Primer, der ca. 200 bp innerhalb des vermuteten Gens liegt, und reverser Transkriptase über das 5´-Ende der RNA hinaus eine kurze cDNA synthetisiert. Mit dem gleichen Oligonukleotid, das für die "Primer Extension" verwendet wird, wird ein im zu untersuchenden Bereich synthetisiertes PCR-Produkt sequenziert und die Sequenzleiter zusammen mit dem Primer-Verlängerungs-Produkt auf einem denaturierenden 8%igen Polyacrylamidgel (s. II.7.3.5) analysiert. Anhand der Sequenzleiter kann das 5´-Ende der RNA sowie die zugehörige Promotersequenz abgelesen werden.

7.12.1 Puffer und Lösungen

<u>NEW-Puffer</u>	Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
	NaCl	750 mM
	Na-EDTA	10 mM
	SDS	0,5% (w/v)
	Glykogen	40 µg/ml

Aqua Phenol (s. II.7.1.1)

7.12.2 Primer-Verlängerungs-Analyse („Primer Extension“)

Für die Synthese der Primer-Verlängerungs-Produkte wurden Komponenten des „Reverse Transcription Systems“ der Firma Promega (Mannheim) in folgendem Ansatz verwendet:

10x RT-Puffer (Promega)	5 µl
Gesamt-RNA (s. II.7.1.3)	10 µg
³² P-markierter Primer (s. II.7.11.2)	5 µl
DEPC-H ₂ O	ad 25 µl

Zum „Primer Annealing“ wurde der Ansatz für 10 min. bei 70°C in einem Metallblock in einem Hybridisierungssofen (OV 5, Biometra, Göttingen) inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde der Metallblock mit den Proben aus dem Hybridisierungssofen genommen und langsam auf mindestens 42°C abgekühlt. Dem Ansatz wurden

10 mM dNTP's (Promega)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM, Promega)	10 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl, Promega)	1 µl
AMV-Reverse Transkriptase (Promega)	1 µl
DEPC-H ₂ O	11 µl

zugegeben, und es erfolgte ein Inkubationsschritt für 30 min. bei 42°C. Nach Zugabe von RNase (2 units) und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz mit 250 µl NEW-Puffer versetzt und die DNA mit 250 µl Phenol/Chloroform (1:1) ausgeschüttelt. Zur Phasentrennung wurde 5 min. bei 13000 UpM und RT (Biofuge Pico) zentrifugiert und schließlich zur Präzipitation 250 µl Überstand zu 900 µl Ethanol_{absolut} gegeben und die DNA für 20 min. auf Trockeneis gefällt. Nach Zentrifugation für 20 min. bei 13000 UpM und RT wurde das Pellet einmal in 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und schließlich für 20 min. an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 30 µl Formamid-Auftragspuffer (s. II.7.3.1) aufgenommen, für 2 min. bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. 10 µl des Ansatzes wurden zur Analyse auf ein 8%iges (w/v) Sequenzgel (s. II.7.3.5) aufgetragen.

7.12.3 Manuelle Sequenzierung von PCR-Produkten

Zur manuellen Sequenzierung von PCR-Produkten wurde das fmol[®] DNA Cycle Sequencing System der Firma Promega (Mannheim) eingesetzt, und das Protokoll

für die Verwendung endmarkierter Primer in Terminations-Reaktionen angewendet. Vom Herstellerprotokoll abweichend wurden 6 µl des radioaktiv markierten Primers (s. II.7.11.2) und 100 ng PCR-Produkt als Template eingesetzt.

8. Proteinchemische Methoden

8.1 Magnetische DNA-Affinitätsreinigung nativer DNA-Bindeproteine aus Rohextrakt (Gabrielsen *et al.*, 1989)

8.1.1 Puffer und Lösungen

<u>TBS</u>	Tris-HCl, pH 8,0 NaCl	10 mM 150 mM
<u>2x B & W Puffer</u>	Tris-HCl, pH 7,5 NaCl Na ₂ -EDTA, pH 8,0	10 mM 2 M 1 mM
<u>TE-Puffer pH 7,4</u>	Tris-HCl, pH 7,4 Na ₂ -EDTA, pH 8,0	10 mM 1 mM
<u>10x Puffer A_{(NH₄)₂SO₄}</u>	Tris-HCl, pH 8,0 Na ₂ -EDTA, pH 8,0 (NH ₄) ₂ SO ₄	200 mM 10 mM 800 mM
<u>Puffer A</u>	Tris-HCl, pH 8,0 Na ₂ -EDTA, pH 8,0 Glycerin Nonidet P-40	20 mM 10 mM 15% (v/v) 0,05% (v/v)
<u>Puffer A₇₅</u>	Tris-HCl, pH 8,0 Na ₂ -EDTA, pH 8,0 Glycerin Nonidet P-40 NaCl	20 mM 10 mM 15% (v/v) 0,05% (v/v) 75 mM
<u>Puffer A₁₀₀₀</u>	Tris-HCl, pH 8,0 Na ₂ -EDTA, pH 8,0 Glycerin Nonidet P-40 NaCl	20 mM 10 mM 15% (v/v) 0,05% (v/v) 1 M

8.1.2 Herstellung von „*Sulfolobus islandicus*“ Rohextrakten

Zur Herstellung des „*Sulfolobus islandicus*“ Proteinrohextraktes wurde der Wirtstamm für SIRV1, „*S. islandicus*“ REN2H1, in 1 l SI-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 UpM für 20 min. und 4°C (Beckman, Avanti™ J-25, Beckman Coulter, Fullerton, USA) geerntet. Das Pellet wurde in 10 ml TBS-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 0,1% (v/v) Triton X100 und vier mal 30 s Ultraschallbehandlung (Sonifier 250, Branson, Danbury, USA) aufgeschlossen. Zellfragmente wurde durch Zentrifugation bei 17000 UpM und 4°C abgetrennt. Der proteinhaltige Überstand wurde nach Konzentrationsbestimmung (s. II.8.4.1) in 500 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Für Rohextraktpräparationen aus virusinfizierten Zellen wurde analog vorgegangen. Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,2 mit einer m.o.i von 1 infiziert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert.

8.1.3 Durchführung

Für die magnetische DNA Affinitätsreinigung mussten zunächst die DNA-Affinitäts-Kügelchen hergestellt werden. Dazu wurden 400 µl Dynabeads® M-280 Streptavidin (10 mg/ml) der Firma Dynal Biotech (Hamburg) in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und unter Verwendung eines magnetischen Separators einmal in 500 µl 1× B & W-Puffer gewaschen, dann in 400 µl 2× B & W-Puffer resuspendiert und auf zwei 1,5 ml ERG aufgeteilt. Zu jedem Reaktionsgefäß wurden 200 µl 2× B & W-Puffer gegeben, um schließlich je 400 µl Dynabeads einer Konzentration von 5 µg/µl zu erhalten. Zu jedem Ansatz wurden 400 µl 1× B & W-Puffer und 5 µg über PCR gewonnenes biotinmarkiertes DNA-Fragment (s. II.7.8.6) gegeben, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und schließlich für 30 min. bei RT im Überkopfschüttler inkubiert. Nach magnetischer Separation wurden die Affinitätskügelchen dreimal in je 500 µl 1× B & W-Puffer gewaschen, in insgesamt 150 µl TE-Puffer pH 7,4 resuspendiert, vereinigt und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt.

Für die Affinitätsreinigung von DNA-Bindeprotein aus dem Proteinrohextrakt wurde zu den 150 µl DNA-Affinitätskügelchen folgender Ansatz pipettiert:

pUC 18 DNA (4 µg/µl)	50 µl
Glycerin 87% (v/v)	30 µl
10 x Puffer A _{(NH₄)₂SO₄}	200 µl
Nonidet P-40	1 µl
H ₂ O _{bidest}	1154 µl
Rohextrakt (1,4 mg Gesamtprotein)	250 µl

Dabei wurde darauf geachtet, dass der Rohextrakt im letzten Schritt zugeben wurde. Der Reaktionsansatz wurde unmittelbar nach Zugabe des Gesamtproteins durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und für 5 min. bei 25°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 2 ml Puffer A verdünnt und auf vier ERG aufgeteilt. Nach erfolgter Separation wurden die Beads zweimal mit je 125 µl Puffer A₇₅ gewaschen und dabei in einem ERG vereinigt. Für die Elution des gebundenen Proteins wurden 100 µl Puffer A₇₅ mit 50 µl Puffer A₁₀₀₀ gemischt und zu den Beads gegeben. Nach vorsichtigem Mischen durch Auf- und Abpipettieren wurde für 5 min. bei RT inkubiert und schließlich nach magnetischer Separation die 150 µl Eluat gesammelt. Zur Analyse wurden 15 µl des Eluats mit 3 µl 5x Protein Auftragspuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und auf ein 15%iges (w/v) SDS-Gel (s. II.8.4.2) aufgetragen. Die Proteinbanden wurden durch anschließende Silberfärbung (s. II.8.4.4) sichtbar gemacht.

8.2 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Für die Expression von rekombinantem ORF 56-Protein und SSo0048 wurde das pET-Vektor-System der Firma Novagen (Madison, USA) eingesetzt. Für beide rekombinant exprimierten Proteine wurde der Vektor pET 30a verwendet und aufgrund der zu erwartenden geringen Größe der Proteine (6,5 kDa und 14 kDa) ohne Anfügung eines Tags kloniert. Die „Multiple Cloning Site“, in die das Fremdgen einkloniert wurde, steht unter Kontrolle des T7-Promoters. Bei dem verwendeten Expressionsstamm *Rosetta (DE3) pLysS* handelt es sich um ein *E. coli* BL21 *lacZY* (Tuner™) Derivat, das chromosomal unter Kontrolle des *lac*-UV5 Promoters für die T7-RNA-Polymerase codiert. Die Expression der T7 Polymerase kann durch die Zugabe von IPTG ins Medium induziert werden und hat zur Folge, daß das eingeschleuste Fremdgen exprimiert wird. Die normalerweise auch ohne Zugabe von IPTG erfolgende Basalexpression der T7-Polymerase wird durch ein im Expressionsstamm zusätzlich vorhandenes Plasmid (pLysS) weitgehend unterdrückt.

Das *lysS* Gen codiert für ein T7 Lysozym, einen natürlichen Inhibitor der T7 Polymerase, der allerdings nur schwach exprimiert wird und durch die Zugabe von IPTG ins Medium aufgehoben wird. Als Marker trägt dieses Plasmid eine Chloramphenicol-Resistenz. Zusätzlich trägt der RosettaTM-Stamm auf demselben Plasmid Gene, die für in *E. coli* seltene tRNA-Spezies (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA) codieren, wodurch die Expression von rekombinantem Protein, das einen überdurchschnittlich hohen Anteil seltener Codons enthält, verbessert werden kann.

8.2.1 Puffer und Lösungen

<u>PBS-Puffer</u>	Natriumphosphat, pH 8,0 NaCl	10 mM 150 mM
<u>N100-Puffer</u>	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl	50 mM 300 mM
<u>N300-Puffer</u>	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl	50 mM 100 mM

8.2.2 Durchführung der Proteinexpression

Die Expression von ORF 56 und SSo0048-Protein erfolgte in 1 l LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol. Das Medium wurde mit 10 ml einer Übernacht-Kultur der entsprechenden positiven Transformanten beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37°C hochgeschüttelt. Die Genexpression wurde durch Zugabe von 1 mM (Endkonzentration) IPTG induziert und die Kultur für weitere 4 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Zur Ernte der Zellen wurden diese für 30 min. bei 5000 UpM und 4°C abzentrifugiert (Beckman, AvantiTM J-25, Beckman Coulter, Fullerton, USA). Das Pellet wurde in 20 ml PBS-Puffer gewaschen und erneut für 5 min. bei 4500 UpM zentrifugiert (Labofuge© 400R; Heraeus Osterode). Das Pellet wurde im Fall des ORF 56-Proteins in 20 ml N300-Puffer, im Fall von SSo0048 in N100-Puffer aufgenommen, mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C eingefroren. Zur Induktionsverfolgung wurde unmittelbar vor der Induktion sowie 1 h, 2 h, 3 h und 4 h nach Induktion jeweils 1 ml der Kultur entnommen und 1 min. bei 13000 UpM in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Die Pellets der Proben 1 h bis 3 h nach der Induktion wurden bis zur gemeinsamen

Aufarbeitung mit der 4 h Probe bei -20°C eingefroren. Die erhaltenen Zellpellets wurden aufgetaut, in 250 µl PBS-Puffer resuspendiert, mit 250 µl 2× Protein Auftragspuffer versetzt und für 5 min. bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde 1 min. bei 13000 UpM zentrifugiert und je 20 µl der Proteingesamtfraktion auf einem 12-19,5%igem (w/v) SDS-Gel analysiert (s. II.8.4.2)

8.3 Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Die mit Lysozym behandelte Zellsuspension aus 1 ml Expressionskultur (s. II.8.2.2) wurde im Wasserbad aufgetaut und zum Zellaufschluss auf Eis vier mal 30 s mit gepulstem Ultraschall aufgeschlossen. Verwendet wurde dazu ein Sonifier 250 (Branson, Danbury, USA) mit konischer Mikrospitze. Dabei wurden „output“ 4 und 40% „duty cycle“ (Puls) als Parameter gewählt. Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (Beckman Avanti™ J-25, Beckman Coulter, Fullerton, USA; JA-25.50 Rotor, 20 min., 17000 UpM, 4°C) entfernt und der Proteinüberstand bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4°C gelagert.

8.3.1 Puffer und Lösungen

<u>N100-Puffer</u>	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl	50 mM 100 mM
<u>N300-Puffer</u>	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl	50 mM 300 mM
<u>N1000-Puffer</u>	Tris/HCl, pH 8,0 NaCl	50 mM 1 M

8.3.2 Reinigung von rekombinantem ORF 56-Protein

20 ml Proteinüberstand wurden für 30 min. bei 75°C inkubiert, um den Großteil der hitzelabilen *E. coli* Proteine zu denaturieren. Die Proteinaggregate wurden durch Zentrifugation für 20 min. bei 17000 UpM und 4°C (Beckman Avanti™ J-25, Beckman Coulter, Fullerton, USA; JA-25.50 Rotor) entfernt und der Überstand, der

das hitzestabile ORF 56-Protein enthielt, einer Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose (Äktapurifier System, Amersham Biosciences, Freiburg; Hitrap™ Heparin HP, 5 ml) unterzogen. Die Elution der ORF 56-Protein enthaltenden Fraktionen erfolgte in einem linearen NaCl-Gradienten (300 mM bis 10000 mM) bei 700 mM NaCl. Den Salzpuffern N300 und N1000 wurde unmittelbar vor der Chromatographie 15 mM β -Mercaptoethanol zugesetzt.

8.3.3 Reinigung des rekombinanten Transkriptionsfaktors SSo0048

Die Reinigung des Transkriptionsfaktors SSo0048 erfolgte analog Punkt II.8.3.2. Zur Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose wurde das Äktapurifier System (Amersham Biosciences, Freiburg) eingesetzt. Die Elution der SSo0048 enthaltenden Proteinfaktionen erfolgte ebenfalls in einem linearen NaCl-Gradienten (100 mM bis 1000 mM) bei einer Salzkonzentration von 230 mM NaCl. Den Salzpuffern N100 und N1000 wurde unmittelbar vor der Chromatographie 15 mM β -Mercaptoethanol zugesetzt.

8.4 Analyse von Proteinlösungen

8.4.1 Proteinmengenbestimmung nach Bradford (1976)

Die Gesamtprotein-Bestimmung nach Bradford erfolgte unter Verwendung des Coomassie Plus™ Protein Assay Reagents der Firma Pierce (Rockford, USA). Zur Proteinbestimmung wurden 0 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 4 μ g, 10 μ g und 20 μ g BSA, bzw. 10 bis 100 μ l der zu bestimmenden Proteinlösung mit dem Nachweisreagenz in einer Halbmikroküvette gemischt und nach 10 minütiger Inkubation bei RT die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die gemessenen Absorptionswerte der definierten BSA-Mengen dienten zur Erstellung einer Eichgeraden, mit deren Hilfe die Proteinkonzentration der zu bestimmenden Lösung abgelesen werden konnte.

8.4.2 SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

Puffer und Lösungen

<u>1x Laufpuffer</u>	Tris Glycin H ₂ O _{bidest}	3,0 g 14,4 g ad 1000 ml
<u>4x Trenngelpuffer</u>	Tris/HCl, pH 8,8 SDS	1,5 M 0,4% (w/v)
<u>4x Sammelgelpuffer</u>	Tris/HCl, pH 6,8 SDS	0,5 M 0,4% (w/v)
<u>5x Proteinauftragspuffer</u>	Tris/HCl pH 6,8 SDS DTT Saccharose Bromphenolblau	250 mM 5% (w/v) 250 mM 50% (w/v) 0,5% (w/v)
<u>2x Proteinauftragspuffer</u>	4x Trenngelpuffer SDS β-Mercaptoethanol Glycerin Bromphenolblau	25% (v/v) 2% (w/v) 5% (v/v) 20% (v/v) 0,025% (w/v)

	5,6% (w/v) Sammelgel	12% (w/v) Trenngel	15% (w/v) Trenngel	19,5% (w/v) Trenngel
4x Trenngelpuffer	-	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
4x Sammelgelpuffer	1,0 ml	-	-	-
30% Acrylamid-Bis-Lösung (37,5:1)	0,75 ml	1,6 ml	2,0 ml	2,6 ml
H ₂ O _{bidest}	2,25 ml	1,4 ml	1,0 ml	0,4 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
10% APS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl

Durchführung

Die Analyse von Proteingelen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Zur Auftrennung wurden 12-19,5%ige (w/v) Trenngele (10 × 7 cm, Dicke: 0,75 mm) gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Wasser abgegossen und das Trenngel mit einem 5,6%igem (w/v) Sammelgel überschichtet und ein Kamm mit 10 bis 14

Auftragstaschen eingesetzt. Proben mit einem Volumen von 10 µl wurden vor dem Auftrag 1:1 mit 2× Proteinauftragspuffer, Proben mit einem Volumen von 15-20 µl mit $\frac{1}{5}$ Volumen eines 5× Proteinauftragspuffers versetzt und für 5 min. in einem Heizblock bei 95°C für 5 min. denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1× SDS-PAGE-Laufpuffer in einer Mini Protean III Gelapparatur (BioRad) bei einer konstanten Spannung von 200 V, bis die Bromphenolblaubande die untere Gelkante erreicht hatte.

8.4.3 Coomassie Färbung und Trocknung von SDS-Gelen

Puffer und Lösungen

<u>Coomassie-Färbelösung</u>	Coomassie Blau R250	0,1% (w/v)
	Methanol	10% (v/v)
	Eisessig	10% (v/v)
<u>Entfärbelösung</u>	Methanol	10% (v/v)
	Eisessig	10% (v/v)

Durchführung

Das Gel wurde mit Färbelösung überschichtet und für 10 s bei maximaler Leistung (700 W) in der Mikrowelle erhitzt. Nach Inkubation für ca. 5 min. bei Raumtemperatur unter langsamem Schütteln wurde die Färbelösung abgegossen und überschüssige Färbelösung mit H₂O_{bidest} abgespült. Zur Entfärbung wurde das Gel mit reichlich Entfärbelösung überschichtet und bis zum gewünschten Entfärbungsgrad, unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung bei Raumtemperatur unter langsamen Schwenken gewaschen. Dabei diente ein Stück Zellstoff zur Aufnahme der ausgewaschenen Farbe. Zur Konservierung der Gele wurden diese in einer Geltrocknungs-Apparatur (DryGel Sr. SE1160, Hoefer, San Francisco, USA) für 1 h unter Vakuum getrocknet und zur Dokumentation mit einem Flachbettscanner digitalisiert.

8.4.4 Silberfärbung von SDS-Gelen (Blum *et al.*, 1987)

Puffer und Lösungen

<u>Fixierer 1</u>	Methanol Eisessig	50% (v/v) 10% (v/v)
<u>Waschlösung 1</u>	Ethanol	50% (v/v)
<u>Waschlösung 2</u>	Ethanol	10% (v/v)
<u>Fixierer 2</u>	Na ₂ S ₂ O ₃ (0,2%, w/v) H ₂ O _{bidest}	10 ml 80 ml
<u>Färbelösung</u>	AgNO ₃ (0,1%, w/v) Formaldehyd (37%, v/v)	100 ml 75 µl
<u>Entwickler</u>	Na ₂ CO ₃ (6%, w/v) Formaldehyd (37%, v/v)	100 ml 50 µl
<u>Stopppad</u>	Eisessig Methanol	10% (v/v) 10% (v/v)

Durchführung

Da Proteine mit Coomassie nur bis zu einer Konzentration von ca. 50 ng angefärbt werden können, wurde für kleinere Proteinmengen eine sensitivere Silberfärbung durchgeführt. Dazu wurden die SDS-Gele nach erfolgter Elektrophorese (s. II.8.4.2) nach folgendem Schema behandelt:

Lösung	Inkubationszeit
Fixierer 1	30 min.
Waschlösung 1	10 min.
Waschlösung 2	10 min.
Fixierer 2	1 min.
H ₂ O _{bidest}	3 × 20 s
Färbelösung	20 min.
H ₂ O _{bidest}	2 × 20 s
Entwickler	nach Bandenintensität
Stopppad	bis keine Blasen mehr aufsteigen

Die Trocknung der Gele, sowie deren Dokumentation, erfolgte wie unter II.8.4.3 beschrieben.

8.4.5 Massenspektroskopie

Massenspektroskopische Analysen von Proteinen wurden in Kooperation mit Dr. Stephen Bell und Dr. SewYeu Peak-Chew am MRC Laboratory of Molecular Biology, Mass Spectrometry Facility, in Cambridge, England durchgeführt. Die nach SDS-Gelelektrophorese erhaltenen Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und im Gel mit Trypsin verdaut. Die isolierten Peptide wurden an einer Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (PerSeptive Biosystems) analysiert. Die Analyse der erhaltenen Peaks sowie die Sequenzdatenanalyse wurde mit dem Mascot-Programm durchgeführt.

9. Untersuchung von DNA-Protein-Interaktionen

9.1 Gel-Verzögerungstests („Electric Mobility Shift Assay“, EMSA)

Mit Hilfe von Gel-Verzögerungstests wurde die Bindung des ORF 56-Proteins von SIRV1 an Promotor-DNA untersucht. Bei Gel-Verzögerungstests wird das entsprechende DNA-Fragment mit dem zu untersuchenden Protein inkubiert und der entstandene Protein-DNA-Komplex einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. II.7.3.4) unterworfen. Zusätzlich wird in dem Gel auch das nicht komplexierte DNA-Fragment analysiert. Bindet das zu untersuchende Protein an die DNA, verzögert dies das Laufverhalten des Fragments und die DNA Bande erscheint an höherer Position im Gel („band shift“) als die ungebundene DNA.

9.1.1. Herstellung eines 250 bp langen Promotortemplates

Zur Herstellung des Promotortemplates wurde ein mit ^{32}P radioaktiv markiertes PCR-Produkt generiert (§. II.7.8.7). Als Primer wurden die Oligonukleotide 5432S1F und 5679S1R (=SIRV1/VIII P56R) verwendet, wobei der Primer 5432S1F zuvor mit ^{32}P radioaktiv markiert wurde (§. II.7.11.2). Als Matritze diente ein Plasmid, in welches der ORF 56-Promoterbereich einkloniert wurde. Um im Gel-Verzögerungstest ein

optimales Resultat zu erzielen, wurde das gewonnene PCR-Produkt über ein natives Polyacrylamidgel wie unter II.7.5 beschrieben und anschließend nochmals über eine Probe QuantTM G-50 Micro Column (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerprotokoll gereinigt. Anschließend wurde das markierte Template 10fach in H₂O_{bidest} verdünnt und 2 µl der Verdünnung wurden im Gel-Verzögerungstest als Template eingesetzt.

9.1.2 Herstellung doppelsträngiger Oligonukleotidtemplates

Um kürzere, sequenzspezifischere Templates herzustellen, wurden komplementären Oligonukleotide gegeneinander hybridisiert. Dazu wurden je 3000 pmol der Oligonukleotide in 100 µl TE, pH 7,4 in Gegenwart von 200 mM NaCl miteinander gemischt. Der Ansatz wurde in einem Heizblock für 5 min. bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde der Heizblock ausgeschaltet und die Proben im Heizblock gelassen, bis sie auf Raumtemperatur abgekühlt waren. Die Ansätze wurden wie unter II.7.5 beschrieben über ein natives Polyacrylamidgel gereinigt. 200 ng des gereinigten Templates wurden mit T4-Polynukleotidkinase wie unter II.7.11.2 beschrieben mit ³²P markiert, wobei keine Hitzeinaktivierung erfolgte. Die T4-Polynukleotidkinase sowie nicht inkorporiertes [γ ³²P] ATP wurden unter Verwendung des QIA Nukleotide Removal Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers entfernt. Die Elution des markierten Oligonukleotids vom Säulchen erfolgte mit 50 µl H₂O_{bidest}. Anschließend wurde das markierte Template 10fach in H₂O_{bidest} verdünnt und 1 µl der Verdünnung im Gel-Verzögerungstest als Template eingesetzt.

9.1.3 Durchführung

Ein 20 µl Reaktionsansatz enthielt 2 µl 50% (v/v) Glycerin, 2 µl 10× T-Puffer (500 mM Tris/HCl, pH 8,0, 750 mM KCl, 250 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1-2 µl Template, 0-1 µg Poly [dI, dC] und 0-1 µg ORF 56-Protein, wobei der Volumenausgleich mit H₂O_{bidest} erfolgte. Bei der Zusammenstellung des Reaktionsansatzes wurde darauf geachtet, dass das eingesetzte Protein als letzte Komponente zugegeben wurde. Der Ansatz wurde durch zweimaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt, für 2 s anzentrifugiert, für 15 min. bei 48°C inkubiert und anschließend sofort auf ein 20 × 20

cm großes 1,5 mm dickes natives 5 bis 8%iges (w/v) Polyacrylamidgel aufgetragen (s. II.7.3.4).

9.2 *In vitro*-Transkription

In vitro-Transkriptionsexperimente mit den Proteinen P56 und SSo0048 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Stephen Bell (MRC Cancer Cell Unit, Hutchison MRC Centre, Cambridge, England) durchgeführt. Es wurde das rekonstituierte System von *Sulfolobus* (Qureshi *et al.*, 1997) verwendet. Die nach Qureshi *et al.*, 1997 und Qureshi *et al.*, 1995 gereinigten Proteinkomponenten TATA-Bindeprotein (TBP), Transkriptionsfaktor B (TFB) und RNA-Polymerase wurden mir dabei zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der DNA-Templates wurden PCR-Produkte der Promotoren in den Vektor pDRIVE kloniert (s. II.7.8.4 u. II.7.9). Für die *in vitro*-Transkriptionsreaktion wurden die Promotortemplates mit TBP, TFB, RNA-Polymerase und dem zu untersuchenden Protein inkubiert. Der Nachweis der Transkriptionsinitiationsprodukte erfolgte über eine sekundäre "Primer Extension" Reaktion.

9.2.1 Puffer und Lösungen

<u>10x Transkriptionspuffer</u> (T-Puffer)	Tris/HCl, pH 8,0	500 mM
	KCl	750 mM
	MgCl ₂	250 mM
	DTT	10 mM

NEW-Puffer (s. II.7.12.1)

Aqua Phenol (s. II.7.1.1)

9.2.2 Durchführung

Für die *in vitro*-Transkriptionsreaktion wurden, um eine vorzeitige unspezifische Reaktion der Proteine mit dem Template zu vermeiden, zunächst zwei Mastermixe hergestellt:

Mastermix 1:

10x Transkriptionspuffer	2,5 µl
NTP`s (2 mM)	2,5 µl
TBP	20 ng
TFB	20 ng
RNA-Polymerase	250 ng
P56/SSo0048	0-1 µg
H ₂ O _{bidest}	ad 25 µl

Mastermix 2:

10x Transkriptionspuffer	2,5 µl
NTP`s (2 mM)	2,5 µl
Promotorplasmid	100 ng
H ₂ O _{bidest}	ad 25 µl

Beide Mastermixe wurden auf Eis pipettiert. Unter weiterer Kühlung wurden in einem 1,5 ml ERG je 25 µl der beiden Mastermixe miteinander vermischt, kurz anzentrifugiert und die *in vitro* Transkription bei 70°C für 20 min. durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 µl NEW-Puffer gestoppt und nach Zugabe von 1 µl radioaktiv markiertem Primer die Nukleinsäuren mit 250 µl Phenol/Chloroform (1:1) ausgeschüttelt. Zur Trennung der Phasen wurde für 5 min. bei Raumtemperatur und 13000 UpM (Biofuge Pico) zentrifugiert. 250 µl des Überstandes wurden abgenommen, und zur Fällung der Nukleinsäuren zu 900 µl Ethanol_{absolut} gegeben. Zur vollständigen Präzipitation wurde für 20 min. auf Trockeneis inkubiert und schließlich für weitere 20 min. bei 13000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 1 ml 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen und für 20 min. an der Luft getrocknet. Unmittelbar vor Gebrauch wurde der Reaktionsmix für die reverse Transkriptionsreaktion nach folgendem Ansatz hergestellt:

Reverse Transkription (RT)-Mix:

5x RT-Puffer	4 µl
dNTP`s (2 mM)	2 µl
RNasin (40 U/µl)	0,5 µl
AMV Reverse Transkriptase (24 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O _{DEPC}	ad 20 µl

Das Pellet wurde im RT-Mix resuspendiert. Die vollständige Aufnahme des Pellets in den Reaktionsmix wurde mit einem Geigerzähler (Modell LB 122, Berthold Technologies, Bad Wildbach) überprüft. Die reverse Transkriptionsreaktion erfolgte für 30 min. bei 42°C. Nach erfolgter Inkubation wurde dem Ansatz 20 µl Formamid-Auftragspuffer (s. II.7.3.1) zugesetzt, zur vollständigen Denaturierung für 5 min. bei 95°C aufgeköcht und nach schnellem Abkühlen auf Eis auf einem 8%igem (w/v) denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert (s. II.7.3.5).

9.3 DNase I Footprinting

Um die Bindestelle des Transkriptionsfaktors SSo0048 zu identifizieren, wurde ein sogenanntes DNase I Footprinting durchgeführt. Dabei wird das zu untersuchende Protein zunächst mit der DNA Zielsequenz inkubiert und anschließend mit DNase I verdaut. Analysiert man die erhaltenen DNA Fragmente mit einer entsprechenden Negativkontrolle auf einem 8%igem (w/v) denaturierenden Sequenzgel sind die Bereiche, an denen das Protein an die DNA gebunden hat, dadurch zu erkennen, dass an vor Abbau geschützten Bereichen die entsprechenden DNA-Fragmente fehlen.

9.3.1 Puffer und Lösungen

10x Transkriptions(T-)puffer (s. II.9.2.1)

NEW-Puffer (s. II.7.12.1)

<u>TE-Puffer, pH 8,0</u>	Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
	Na ₂ -EDTA, pH 8,0	1 mM

9.3.2 Durchführung

Für das DNase I Footprinting wurde zunächst mittels einem ³²P-markierten Primer und PCR (s. II.7.8.7) das DNA Template generiert und wie unter II.7.8.3 beschrieben aufgereinigt. In einem 50 µl Reaktionsansatz wurden 5 µl 10x T-Puffer, 1 µl DNA Template und zu untersuchendes Protein (0-2 µg) gemischt und für 10 min. bei 48°C

in einem Metallblock in einem Hybridsierungssofen (OV 5, Biometra Göttingen) die Bindungsreaktion durchgeführt. Anschließend wurden den Proben je 0,1 Units DNase I zugegeben und für 1 min. bei 48°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 µl NEW-Puffer abgestoppt. Um bei allen 7 Proben die gleiche Einwirkzeit der DNase zu gewährleisten, wurde die DNase-Behandlung der Proben mit 30 s Zeitverzögerung gestartet. Anschließend wurde die DNA wie unter II.9.2.2 beschrieben mit Phenol/Chloroform extrahiert, präzipitiert, einmal mit 75%igem (v/v) Ethanol gewaschen und das Pellet schließlich in 20 µl TE, pH 8,0, resuspendiert. Die Ansätze wurden mit je 20 µl Formamid-Auftragspuffer (s. II.7.3.1) versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und nach schnellem Abkühlen auf Eis auf einem 8%igem (w/v) denaturierenden Polyacrylamidgel (s. II.7.3.5) analysiert.

III. ERGEBNISSE

A) Untersuchung der Transkription der Genome der Viren SIRV1 und SIRV2 *in vivo*

1. Nachweis virusspezifischer Transkripte in „*Sulfolobus islandicus*“ REN2H1 und LAL14/1 in Abhängigkeit des Infektionszyklus

Die Transkription von SIRV1 Variante VIII (SIRV1/VIII) wurde in *Sulfolobus islandicus* REN2H1 untersucht. SIRV2 wurde in *S. islandicus* LAL14/1 vermehrt. Zur Synchronisierung der Zellen wurde eine Kultur, die sich in der stationären Phase befand, mit frischem Kulturmedium verdünnt. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit den entsprechenden Viren mit einer m.o.i von 5 infiziert. Die hierbei benötigte Zeit, um 50% der Zellen zu infizieren, liegt bei ca. 14 Minuten. Die „Eclipse“ Periode, das Zeitintervall von der Infektion bis zum Auftreten erster intrazellulärer Viruspartikel, beträgt bei SIRV1 4 h, bei SIRV2 2,5 h. Die Latenzzeit, der Zeitraum zwischen Infektion und Freisetzung der ersten Viruspartikel, liegt bei SIRV1 bei 8 h und bei SIRV2 bei ca. 6 h. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Zeitpunkte für die Isolierung der Gesamt-RNA aus virusinfizierten Zellen gewählt. Es wurden 30 min. nach der Infektion, 1 h nach der Infektion und weiter stündlich bis zu 4 h nach der Infektion 20 ml Aliquots der wachsenden Kulturen entnommen und daraus die Gesamt-RNA präpariert. Zur Kontrolle wurde die RNA aus einer nicht infizierten Kultur isoliert. Gleiche Mengen der zu unterschiedlichen Zeitpunkten isolierten RNAs (5 µg) wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und für Northern Hybridisierungs-Experimente auf Nylonmembranen transferiert. Für die Identifizierung virusspezifischer Transkripte wurden für die Hybridisierungs-Experimente aus den Virus-Genomen spezifische Sonden mit einer Größe zwischen 0,7 kb und 3,7 kb mittels PCR amplifiziert. Insgesamt wurden für SIRV1 11 doppelsträngige DNA-Sonden und für SIRV2 12 doppelsträngige DNA-Sonden (vgl. Abb. 6) hergestellt. Die Koordinaten der jeweils ersten und letzten Nukleotide dieser Fragmente sind in Tabelle 1 angegeben. Zur Erstellung der Tabelle wurden die Ergebnisse von 23 Northern Hybridisierungen

zusammengefasst und ausgewertet. Die Länge der RNAs, die mit den unterschiedlichen Sonden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion identifiziert wurden, ist angegeben und die entsprechenden Leserahmen, deren Transkripte dem detektierten Signal entsprechen müssen, wurden zugeordnet. In einigen Fällen konnten die mit den doppelsträngigen DNA-Sonden erhaltenen Signale nicht eindeutig bestimmten Leserahmen zugeordnet werden. Um diese Bereiche genauer zu untersuchen, wurden Leserahmen-spezifische einzelsträngige Oligonukleotidsonden konstruiert (vgl. Abb. 6 und Tab. 2) und in Northern Hybridisierungs-Experimenten verwendet. Insgesamt wurden 39 Hybridisierungen mit Leserahmen-spezifischen Sonden durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst.

Tabelle 1. Transkripte der Genome der Viren SIRV1 und SIRV2, die durch Northern Hybridisierungen mit doppelsträngigen und einzelsträngigen DNA Sonden identifiziert wurden

dsDNA Sonde (Koordinaten)*	Größe der Transkripte in knt (eingeschlossene ORFs)				
	30 min. nach Infektion	1 h nach Infektion	2 h nach Infektion	3 h nach Infektion	4 h nach Infektion
SIRV1:					
1 (108-2024)	1.0 (90a, 102, 76) 1.2 (90a, 102, 76, 105)	1.0 (90a, 102, 76) 1.2 (90a, 102, 76, 105)	1.0 (90a, 102, 76) 2.2 (90b, 75, 98, 252)	1.0 (90a, 102, 76) 2.2 (90b, 75, 98, 252)	1.0 (90a, 102, 76) 2.2 (90b, 75, 98, 252)
2 (2211-2690)	1.0 (90a, 102, 76) 1.2 (90a, 102, 76, 105)	1.0 (90a, 102, 76) 1.2 (90a, 102, 76, 105)	1.0 (90a, 102, 76)	1.0 (90a, 102, 76)	1.0 (90a, 102, 76)
3 (3821-5720)	<0.24 (56)	<0.24 (56) 2.3 (56, 399, 306)	<0.24 (56) 2.3 (56, 399, 306) 1.1 (399)	<0.24 (56) 2.3 (56, 399, 306) 1.1 (399)	<0.24 (56) 2.3 (56, 399, 306) 1.1 (399)
4 (5547-9279)	1.6 (131, 440) 2.4 (131, 440, 207)	1.6 (131, 440) 2.4 (131, 440, 207)	1.6 (131, 440) 2.4 (131, 440, 207)	1.6 (131, 440) 2.4 (131, 440, 207)	1.6 (131, 440) 2.4 (131, 440, 207)
5 (11173-12738)	1.2 (335) 1.8 (134, 335)	1.2 (335) 1.8 (134, 335)	0.6 (134) 1.2 (335) 1.8 (134, 335)	0.6 (134) 1.2 (335) 1.8 (134, 335)	0.6 (134) 1.2 (335) 1.8 (134, 335)
6 (13062-15281)	0.65 (64, 77, 110) 1.5 (488)	0.65 (64, 77, 110) 1.5 (488)	0.65 (64, 77, 110) 1.5 (488)	0.65 (64, 77, 110) 1.5 (488)	0.65 (64, 77, 110) 1.5 (488)
7 (15461-18169)	1.5 (154, 121, 74, 114) 3.0 (1070)	1.0 (121, 74, 114) 1.5 (154, 121, 74, 114) 3.0 (1070)	1.0 (121, 74, 114) 1.5 (154, 121, 74, 114) 3.0 (1070)	1.0 (121, 74, 114) 1.5 (154, 121, 74, 114) 3.0 (1070)	1.5 (154, 121, 74, 114) 3.0 (1070)

Tabelle 1. (Fortsetzung)

8 (19241-20762)	1.5 (562) 3.0 (1070/562, 417)	1.5 (562) 3.0 (1070/562, 417)	1.5 (562) 3.0 (1070/562, 417)	1.5 (562) 3.0 (1070/562, 417)	1.5 (562) 3.0 (1070/562, 417)
9 (21276-22668)	1.5 (562) 2.8 (562, 417)	1.5 (562) 2.8 (562, 417)	1.5 (562) 2.8 (562, 417)	1.5 (562) 2.8 (562, 417)	1.5 (562) 2.8 (562, 417)
10 (23429-26131)	1.3 (158a, 268) 2.3 (209, 356)	1.3 (158a, 268) 2.3 (209, 356)	1.3 (158a, 268) 2.3 (209, 356)	1.3 (158a, 268) 2.3 (209, 356)	1.3 (158a, 268) 2.3 (209, 356)
11 (26381-29772)	0.65 (90c, 95/241) 1.5 (252, 98, 75)	0.65 (90c, 95/241) 1.5 (252, 98, 75)	0.65 (90c, 95/241) 1.5 (252, 98, 75)	0.65 (90c, 95/241) 1.5 (252, 98, 75)	0.65 (90c, 95/241) 1.5 (252, 98, 75)
2 (5681-6307)	1.0 (105a, 62a, 102)	1.0 (105a, 62a, 102)	1.0 (105a, 62a, 102)	1.0 (105a, 62a, 102)	1.0 (105a, 62a, 102)
3 (6871-9127)	<0.24 (56) 2.2 (56, 399, 310)	<0.24 (56) 2.2 (56, 399, 310)	<0.24 (56) 2.2 (56, 399, 310)	<0.24 (56) 2.2 (56, 399, 310)	<0.24 (56) 2.2 (56, 399, 310)
4 (10016-10980)	1.6 (131b, 436) 2.8 (131b, 436, 207)	1.6 (131b, 436) 2.8 (131b, 436, 207)	1.6 (131b, 436) 2.8 (131b, 436, 207)	1.6 (131b, 436) 2.8 (131b, 436, 207)	1.6 (131b, 436) 2.8 (131b, 436, 207)
5 (14231-15264)	1.2 (335) 1.8 (134, 335)	1.2 (335) 1.8 (134, 335)	1.2 (335) 1.8 (134, 335)	1.2 (335) 1.8 (134, 335)	1.2 (335) 1.8 (134, 335)

SIRV2:

Tabelle 1. (Fortsetzung)

6 (16145-18324)	0.9 (64, 84b, 110) 1.8 (488)	0.9 (64, 84b, 110) 1.8 (488)	0.9 (64, 84b, 110) 1.8 (488)	0.9 (64, 84b, 110) 1.8 (488)
7 (18931-21070)	0.65 (121, 69, 114), 1.5 (154, 121, 69, 114) 3.0 (1070)	0.65 (121, 69, 114), 1.5 (154, 121, 69, 114) 3.0 (1070)	0.65 (121, 69, 114), 1.5 (154, 121, 69, 114) 3.0 (1070)	0.65 (121, 69, 114), 1.5 (154, 121, 69, 114) 3.0 (1070)
8 (22946-24770)	1.5 (564) 3.2 (1070)	1.5 (564) 3.2 (1070)	1.5 (564) 3.2 (1070)	1.5 (564) 3.2 (1070)
9 (25021-26180)	1.6 (564) 3.1 (564, 309)	1.6 (564) 3.1 (564, 309)	1.6 (564) 3.1 (564, 309)	1.6 (564) 3.1 (564, 309)
10 (26771-29080)	1.0 (158a, 269) 1.5 (176, 356)	1.0 (158a, 269) 1.5 (176, 356)	1.0 (158a, 269) 1.5 (176, 356)	1.0 (158a, 269) 1.5 (176, 356)
11 (29649-31841)	0.4 (112), 0.8 (94, 95) 1.2 (249, 98, 73)	0.4 (112), 0.8 (94, 95) 1.2 (249, 98, 73)	0.4 (112), 0.8 (94, 95) 1.2 (249, 98, 73)	0.4 (112), 0.8 (94, 95) 1.2 (249, 98, 73)

*Die Koordinaten der Nukleotide sind entsprechend den in der EMBL/GeneBank Datenbank hinterlegten Sequenzen AJ344253 und AJ414696 angegeben. Die durchschnittliche Länge der Transkripte ist angegeben. In Klammern dahinter sind diejenigen ORFs angegeben, die mit größter Wahrscheinlichkeit vom Transkript eingeschlossen werden. Die Nummern der ORFs beziehen sich auf die Anzahl der Aminosäuren im vorhergesagten Protein. Kursiv sind diejenigen ORFs angegeben, die ebenfalls durch Hybridisierungen mit einzelsträngigen Oligonukleotidsonden bestätigt wurden.

Die Auswertung der erhaltenen Ergebnisse ist beispielhaft anhand der mit der Sonde Nr. 3 für SIRV1 erhaltenen Hybridisierungsergebnisse (Abb. 2) dargestellt. Die Sonde umfasst den Bereich der Leserahmen ORF119, ORF56, ORF399 und ORF306 (s. Abb. 6, SIRV1). Sie hybridisiert stark mit einer kurzen RNA, die kleiner als 0,24 knt ist. Dabei kann es sich nur um das Transkript des Leserahmen ORF56 handeln. Dies konnte durch eine Hybridisierung mit einer ORF56-spezifischen Oligonukleotidsonde bestätigt werden (Abb. 3a). Das Signal im Bereich der Banden mit einer Länge von 2,3 knt könnte durch ein langes Transkript, welches die Leserahmen ORF119, ORF56, ORF399 und ORF306 einschließt, hervorgerufen werden. Da jedoch ORF119 nicht transkribiert ist, was durch das Fehlen eines Signals nach Hybridisierung mit einer ORF119-spezifischen Oligonukleotidsonde festgestellt wurde, wurde dieser Leserahmen vom Operon ausgeschlossen. Bei der RNA von 1,1 knt Länge, die erst 2 h nach der Infektion auftritt, sollte es sich der Größe nach entweder um ein Transkript des Leserahmen ORF399 oder des Leserahmens ORF306 handeln. Eine Hybridisierung mit einem 24 Basen langen Oligonukleotid, komplementär zu einem Bereich der für ORF399 kodierenden Sequenz von SIRV1, ergab ein Signal in diesem Bereich (Abb. 3b) und ließ somit die Schlussfolgerung zu, dass das 1,1 knt Signal ein Transkript des Leserahmen ORF399 darstellt. Ein Transkriptionsstart, ausgehend vom Leserahmen ORF399, konnte ebenfalls durch die Ergebnisse der „Primer Extension“ Analyse (s. III.A.4.) bestätigt werden.

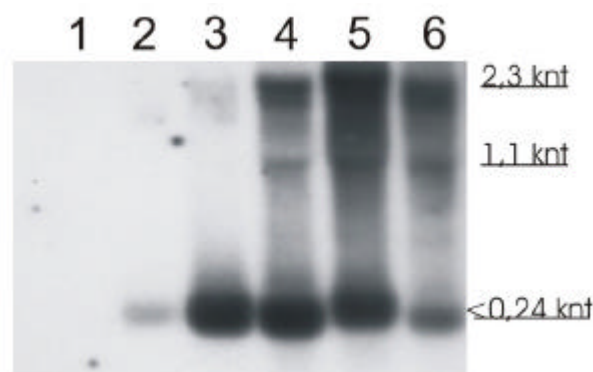


Abbildung 2: Autoradiogramm der Northern Hybridisierung gegen die doppelsträngige SIRV1 DNA Sonde Nr. 3. 1: RNA nicht infizierter Zellen. 2-6: entsprechend 30 min., 1 h, 2 h, 3 h und 4 h nach der Infektion.

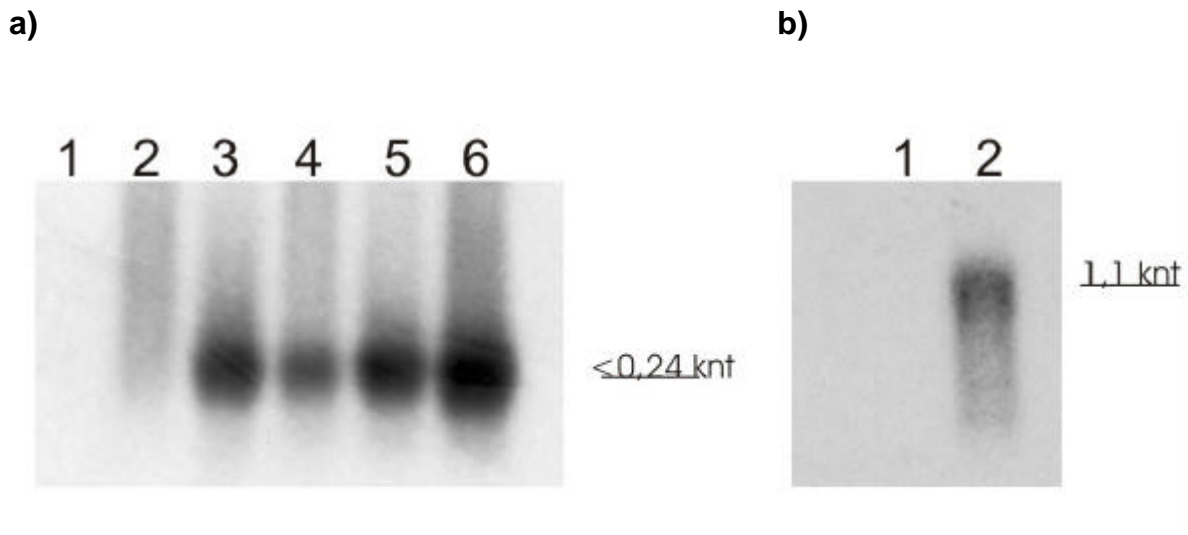


Abbildung 3: Autoradiogramme von Northern Hybridisierungen gegen Leserahmen-spezifischen Sonden. **a)** Hybridisierung gegen die ssDNA-Sonde SIRV1 56. 1: RNA nicht infizierter Zellen. 2-6: entsprechend 30 min., 1 h, 2 h, 3 h und 4 h nach der Infektion. **b)** Hybridisierung gegen die ssDNA-Sonde SIRV1 399. 1: RNA nicht infizierter Zellen. 2: 3 h nach der Infektion.

Die Transkription der „inverted terminal repeat“ (ITR) Region von SIRV1 wurde durch Hybridisierungen mit den Sonden 1 und 11 (Abb. 4a und 4b) untersucht. Die beiden mit der Sonde Nr. 1 erhaltenen Banden mit einer Länge von 0,9 und 1,2 knt konnten ebenfalls mit der außerhalb der ITRs gelegenen Sonde Nr. 2 (Tab. 1, Abb. 6) detektiert werden. Somit handelt es sich offensichtlich um Transkripte, die ausgehend vom linken ITR über dessen Grenze hinausreichen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit beginnen beide mit dem Leserahmen ORF90a, da ein Startpunkt im Bereich des ORF55a durch eine Hybridisierung mit einer Oligonukleotid-spezifischen Sonde, die ein Signal kürzer als 0,5 knt lieferte, ausgeschlossen werden konnte. Das schwache 2,2 knt lange Transkript, welches mit Sonde Nr. 1 erhalten wurde, hybridisiert nicht mit der Sonde Nr. 2 und muß somit aus einer Kreuzhybridisierung mit dem teilweise identisch rechten ITR resultieren. Dies konnte tatsächlich durch die Identifizierung desselben Transkripts mit der Sonde Nr. 11 bestätigt werden (Abb. 4b).

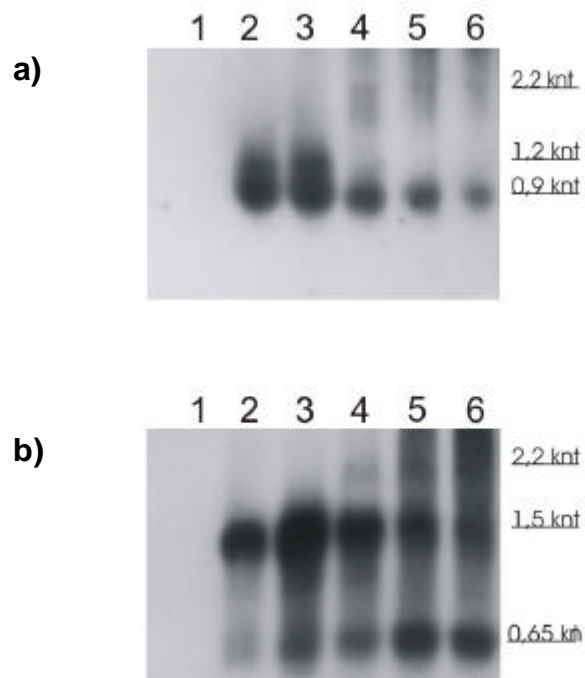


Abbildung 4: Autoradiogramme von Northern Hybridisierungen gegen doppelsträngige DNA-Sonden. **a)** Hybridisierung gegen die SIRV1 DNA-Sonde Nr. 1. 1: RNA nicht infizierter Zellen. 2-6: entsprechend 30 min., 1 h, 2 h, 3 h und 4 h nach der Infektion. **b)** Hybridisierung gegen die SIRV1 DNA-Sonde Nr. 11. 1: RNA nicht infizierter Zellen. 2-6: entsprechend 30 min., 1 h, 2 h, 3 h und 4 h nach der Infektion.

In Abbildung 5 sind weitere Hybridisierungsergebnisse dargestellt. Abbildung 5a zeigt das für SIRV1 mit der Sonde Nr. 8 erhaltene Ergebnis. Im Hybridisierungsbereich der Sonde liegen die Leserahmen 1070 und 562. Es konnten RNAs von ca. 3 knt und 1,5 knt Länge detektiert werden, die die entsprechenden Transkripte der beiden Leserahmen darstellen. Dies konnte ebenfalls mit den Ergebnissen der überlappenden Sonden Nr. 7 und Nr. 9 bestätigt werden (vgl. Abb. 6 und Tab. 1). Die den Bereich der Leserahmen 158a, 269, 176, 356 einschließende doppelsträngige DNA Sonde Nr. 10 (SIRV2) hybridisierte mit zwei RNAs. Eine von ungefähr 1,0 knt Länge und eine weitere von ca. 1,5 knt Länge (Abb. 5b). Die beiden erhaltenen Signale können nur Transkripten

entsprechen, die jeweils ein Operon der Leserahmen 158a und 269, bzw. 176 und 356 darstellen (vgl. Abb. 6).

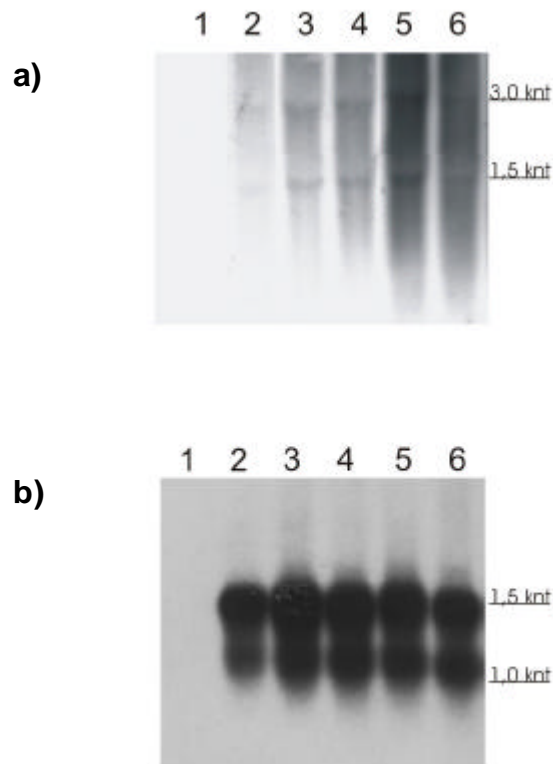


Abbildung 5: Autoradiogramme von Northern Hybridisierungen gegen doppelsträngige DNA-Sonden. **a)** Hybridisierung gegen die SIRV1 DNA-Sonde Nr. 8. 1: RNA nicht infizierter Zellen. 2- 6: entsprechend 30 min., 1 h, 2 h, 3 h und 4 h nach der Infektion. **b)** Hybridisierung gegen die SIRV2 DNA-Sonde Nr. 10. 1: RNA nicht infizierter Zellen. 2-6: entsprechend 30 min., 1 h, 2 h, 3 h und 4 h nach der Infektion.

Tabelle 2. Verwendete Oligonukleotidsonden und damit erhaltene Hybridisierungssignale

Sonde ¹	Oligonukleotid	Hybridisierung +/-	abgeschätzte Größe der erhaltenen Bande
<u>SIRV1:</u>			
55a	1392S1R	+	0,5 knt
399	4817S1F	+	1,1 knt
56	54321S1F	+	< 0,24 knt
119	5694S1F	-	-
81	9024S1R	+	0,3 knt
59	9279S1R	-	-
91	9459S1R	-	-
179	9910S1R	+	0,35 knt
101	10771S1F	-	-
134	11276S1R	+	0,5 knt
335	12500S1R	+	1,0 knt
241	27630S1R	+	0,8 knt
55b	1392S1R	+	0,5 knt
<u>SIRV2:</u>			
83a	34138S2F	+	0,25 knt
119a	1702s2R	+	0,35 knt
103a	2331S2R	+	0,3 knt
90	2783S2R		
109	3146S2F	+	0,3 knt
116	3510S2F	-	-
131a	4192S2R	+	0,65 knt
103b	5196S2F	+	0,65 knt
111	6307S2R	+	0,6 knt
102	12421S2R	+	1,0 knt
84a	12583S2R	+	0,3 knt
59b	12931S2R	-	-
91	13921S2F	-	-
76	14270S2R	-	-
134	14624S2F	+	0,45 knt
55	14652S2R	+	0,7 knt
55int	15246S2R	+	0,9 knt
335	299554S2F	+	0,9 knt
95	30439S2F	+	0,6 knt
112	31380S2F	+	0,4 knt
249	32194S2F	+	1,3 knt
108	32724S2F	+	0,6 knt
105b	33137S2F	+	0,4 knt
119b	336755S2F	+	0,6 knt
83b	34138S2F	+	0,35 knt

¹Die Sonden wurden entsprechend der zugehörigen Leserahmen benannt.

2. Transkriptionskarten der Viren SIRV1 und SIRV2

Die Ergebnisse aller Hybridisierungsexperimente sind schematisch als Transkriptionskarten der beiden Viren in Abbildung 6 dargestellt. Transkripte wurden über das ganze Genom verteilt identifiziert. Bis auf die unten aufgeführten Leserahmen sind alle Gene beider Viren transkribiert. Dies schließt ebenfalls diejenigen ein, die für das eine oder andere der beiden stark ähnlichen Genome spezifisch sind. Nicht transkribiert sind die vier SIRV2-spezifischen Leserahmen SIRV2-ORF156, SIRV2-ORF91, SIRV2-ORF116 und SIRV2 ORF76. Auch die Transkription der Leserahmen SIRV1/SIRV2-ORF119, SIRV1/SIRV2-ORF59, SIRV1/SIRV2-ORF91 und SIRV1-ORF101/SIRV2-ORF103c konnte weder mit den verwendeten doppelsträngigen DNA-Sonden, noch mit Leserahmen-spezifischen Oligonukleotidsonden nachgewiesen werden.

Der früheste Zeitpunkt, zu dem Transkripte deutlich detektiert werden konnten, war 30 min. nach der Infektion. Zu diesem Zeitpunkt waren die meisten Leserahmen beider Genome transkribiert. Im Fall von SIRV1 beginnt die Transkription nahezu gleichzeitig an 21 Stellen auf dem Genom, im Fall von SIRV2 an 29 Startpunkten. Es konnte keine Bevorzugung einer der beiden Stränge beobachtet werden. Beide wurden mit nahezu gleicher Effizienz transkribiert. Die Transkripte sind häufig lang genug, um mehrere Leserahmen einzuschließen, was darauf schließen lässt, dass viele Gene zu Operons gruppiert sind. Die relative Menge der Transkripte kann nur abgeschätzt werden. Dies ist nur in den Fällen möglich, in denen Signale eines Hybridisierungsexperimentes miteinander verglichen werden können. 30 min. nach der Infektion sind alle Transkripte schwach vorhanden; 1 h nach der Infektion nehmen sie an Intensität zu. Eine spätere Abnahme der Intensität der Signale konnte zum Beispiel für SIRV1-ORF56 und die beiden vom linken ITR aus startenden Transkripte beobachtet werden (Abb. 2 u. 4a). Das längere der beiden ITR-Transkripte konnte zu späteren Zeitpunkten nicht mehr beobachtet werden.

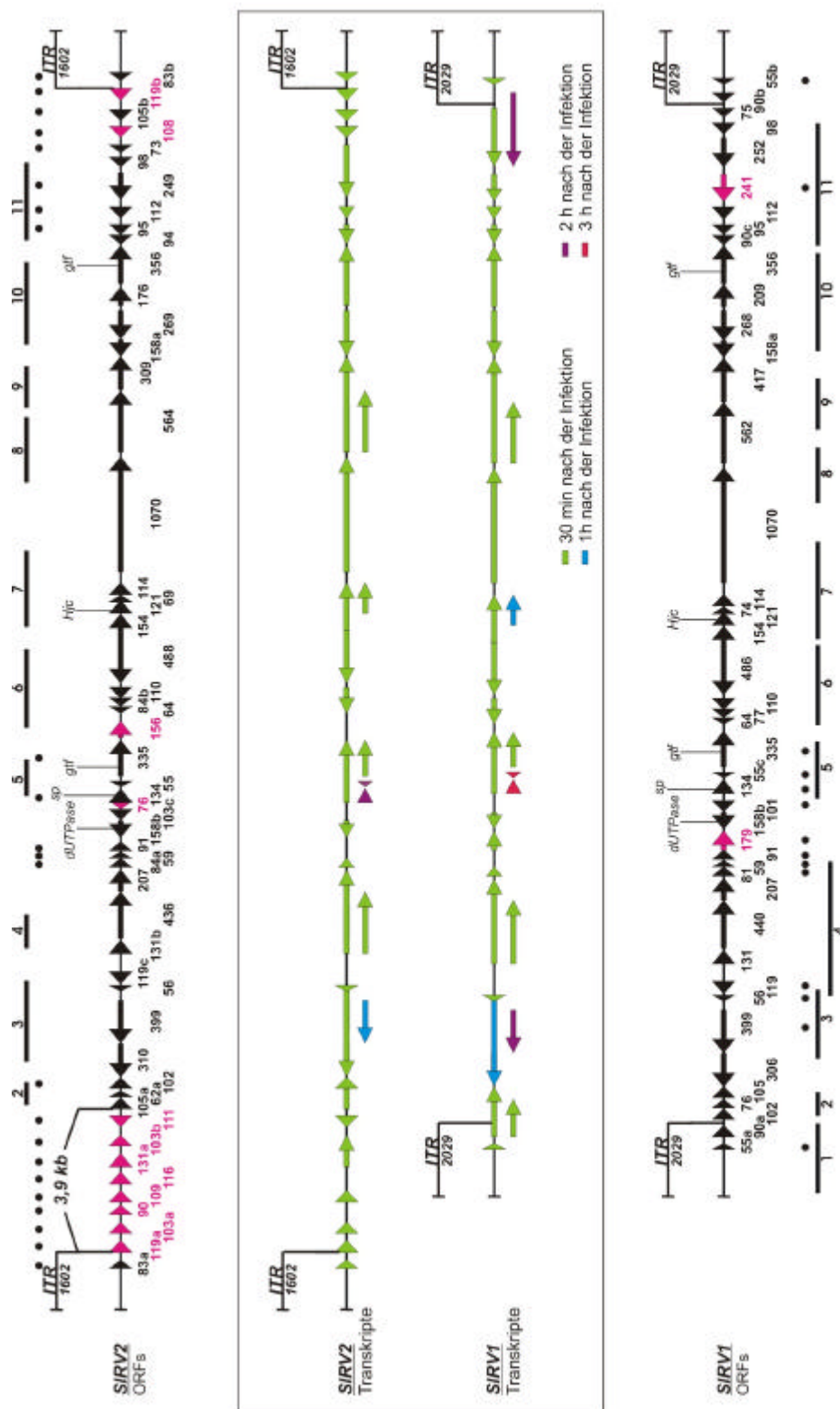
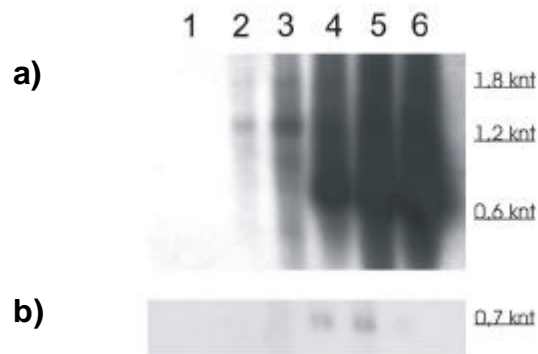


Abbildung 6. Leseramen- und Transkriptionskarten von SIRV1 (Variante VIII) und SIRV2. Die ORF-Karten wurden modifiziert nach Peng *et al.*, 2001. Die Zahlen, die zur Identifizierung der Leseramen verwendet wurden, beziehen sich auf die Anzahl der entsprechenden Codons. Leseramen, die für das eine oder andere Virus spezifisch sind, sind in pink dargestellt. Gene, denen eine definierte oder mögliche Funktion zugeordnet werden kann, sind wie folgt gekennzeichnet: sp, Strukturprotein, Hjc, Holiday Junction Resolvase, dUTPase, Deoxyridin Triphosphatase, ggf, Glykosyltransferase. Die in den Northern Hybridisierungen verwendeten doppelsträngigen DNA-Sonden sind durch Balken gekennzeichnet und entsprechend Tab. 1 nummeriert. Einzelsträngige Oligonukleotidsonden sind durch einen Punkt dargestellt. Die Transkriptionskarten sind in einem Kasten in der Mitte der Abbildung

Nur sehr wenige Transkripte konnten zu einem späteren Zeitpunkt beobachtet werden, z.B. das monocistronische Transkript des Leserahmens 399 oder das vom Leserahmen SIRV1-ORF90b ausgehende Transkript im rechten ITR. Da letzteres jedoch nur relativ schwach zu sehen war, kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass geringe Mengen des Transkripts auch bereits zu einem früheren Zeitpunkt vorliegen, zumal das von identischer Seite im linken ITR ausgehende Transkript bereits 30 min. nach der Infektion zu sehen war.

Das separate Transkript des Leserahmens ORF134 (Abb. 7a, 0,6 knt Bande), der für das Hüllprotein codiert, war deutlich nicht unter den frühen Transkripten zu finden und konnte im Fall von SIRV2 erst 2 h nach der Infektion, im Fall von SIRV1 3 h nach der Infektion nachgewiesen werden. Bemerkenswert erscheint allerdings, dass die ebenfalls mit der Sonde Nr. 5 detektierte 1,8 knt RNA (Abb. 7a) für eine Transkription des Strukturproteingens in Form eines Operons bereits 30 min. nach der Infektion spricht. Der einzige Leserahmen, der ausnahmslos spät im Infektionszyklus transkribiert wird, ist der Leserahmen SIRV2-ORF55/SIRV1-ORF55c. Das Signal eines schwachen Transkripts dieses Leserahmens korreliert mit dem Erscheinen des späten monocistronischen Transkripts des Strukturproteingens (ORF134; Abb. 7b). Auffällig erscheint auch, dass der Transkriptionsstart des ORF55/ORF55c Gens unmittelbar stromabwärts nach dem Gen für das Strukturprotein lokalisiert ist und dessen Transkription in gegenläufiger Richtung zum Strukturproteingen erfolgt. Somit wird eine RNA gebildet, die komplementär zur intergenischen Region des frühen polycistronischen Transkripts der Leserahmen ORF134-ORF335 ist.

Für die Mehrheit der identifizierten und in Abb. 6 dargestellten Transkripte lassen sich nach dem Stopcodon für den letzten oder einzigen Leserahmen im Operon Thymin-reiche Sequenzen erkennen, an denen ein Transkriptionsstop erfolgen könnte.



Abbildungen 7: Autoradiogramme von Northern Hybridisierungen gegen doppelsträngige und Leserahmen-spezifische DNA-Sonden. **a)** Hybridisierung gegen die SIRV2 DNA Sonde Nr. 5. 1: RNA nicht infizierter Zellen. 2-6: entsprechend 30 min., 1 h, 2 h, 3 h und 4 h nach der Infektion. **b)** Hybridisierung gegen die ssDNA-Sonde SIRV2 55c. 1: RNA nicht infizierter Zellen. 2-6: entsprechend 30 min., 1 h, 2 h, 3 h und 4 h nach der Infektion.

3. Vergleich der Transkriptionskarten von SIRV1 und SIRV2

Vergleicht man die Transkriptionskarten beider Viren, wird deutlich, dass für homologe Bereiche der beiden stark ähnlichen Genome auch identische Transkripte existieren. Quantitative Unterschiede ergeben sich lediglich in den Bereichen, in denen Leserahmen transkribiert werden, die spezifisch für das eine oder andere Virus sind. Auch in Abhängigkeit vom Infektionszyklus stimmt die Transkription in beiden Fällen überein. Bei beiden Viren liegen nahezu alle Transkripte bereits 30 min. nach der Infektion vor. Lediglich in den Bereichen der Leserahmen ORF306/ORF310, ORF399, ORF 134 und ORF55/55c ist ein zeitlicher Unterschied im Auftreten der homologen Transkripte zu erkennen. Dabei treten die entsprechenden RNAs in SIRV1 mit einer zeitlichen Verzögerung von 30 min. bis zu 1 h auf. Betrachtet man dazu jedoch, dass SIRV1 eine etwas längere „Eclipse“- und Latenzperiode aufweist als SIRV2, scheint sich dieser Unterschied im Bezug auf den Infektionszyklus zu relativieren.

4. Identifizierung von Transkriptionsstartpunkten und Promotorsequenzen

Um die durch die Kartierung der Transkripte postulierten Transkriptionsstartpunkte zu bestätigen und die zugehörigen Promotorbereiche zu untersuchen, wurden „Primer Extension“-Experimente durchgeführt. Für die Reverse Transkriptionsreaktion wurde RNA aus SIRV1 infizierten Zellen verwendet, die 3 h nach der Infektion präpariert wurde. Zu diesem Zeitpunkt konnten alle viralen Transkripte beobachtet werden. Für 13 Transkripte von SIRV1 wurde das 5'-Ende identifiziert, indem die Primer-Verlängerungsprodukte parallel zu Sequenzleitern, die mit denselben radioaktiv markierten Primern (Tab. 3) erhalten wurden, verglichen wurden. In Abb. 8 sind exemplarisch die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse dargestellt.

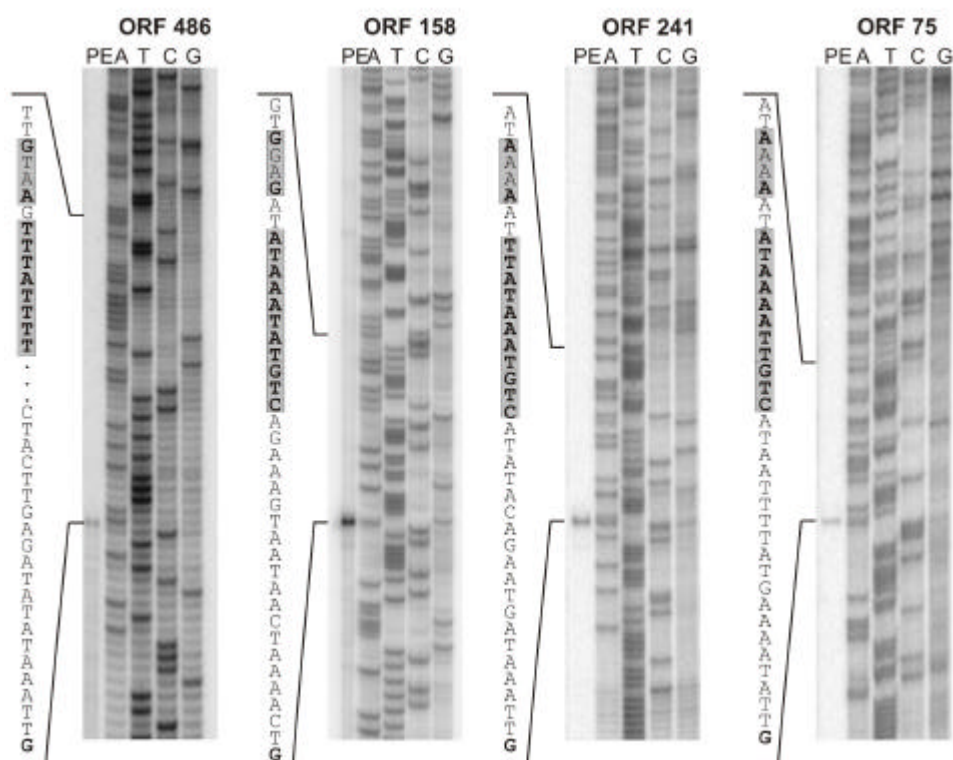


Abbildung 8 Kartierung der Startpunkte von vier Transkripten von SIRV1. Der erste (oder einzige) Leserahmen des Operons ist angegeben. Die Primer-Verlängerungsanalyse wurde mit sequenzspezifischen Primern (s. II.1.3) durchgeführt. Das jeweilige „Run off“ Produkt [PE] wurde parallel zu seinen Sequenzreaktionen (A, T, C, G), die mit demselben radioaktiv markierten Primer ausgeführt wurden, elektrophoretisch aufgetrennt. Die abgeleitete komplementäre Promotorsequenz ist neben dem Autoradiogramm angegeben. TATA-Box, BRE und GTC-Element sind durch fette Schrift und eine graue Schattierung markiert. Der Transkriptionsstart ist in fester Schrift gekennzeichnet.

Durch vergleichende Analyse der experimentell erhaltenen Daten mit den Sequenzdaten konnten alle übrigen Promotorbereiche für SIRV1 und SIRV2 identifiziert werden. Diese sind zusammenfassend in Abb. 9 dargestellt. Der Vergleich der Sequenzen der Transkriptionsstartregionen ergab das Vorhandensein von drei konservierten Sequenzelementen: 1. Eine A/T-reiche 8 Basen lange Sequenz, 20 bis 25 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsstarts gelegen, eine potentielle TATA-Box; 2. Zwei Purine unmittelbar stromaufwärts der potentiellen TATA-Box gelegen, die einem BRE-Element („Transcription Factor B recognition element“) entsprechen könnten. 3. In 70% der Fälle eine Trinukleotid-Sequenz GTC oder, allgemeiner, einer Pentanukleotid-Sequenz $^A/TGTC^A/T$ unmittelbar stromabwärts der angenommenen TATA-Box. Die Promotorregionen der Leserahmen SIRV1-ORF 179, SIRV1-ORF 562 und SIRV1-ORF 112 konnten aufgrund eines sehr hohen A-T-Gehalts (75%) stromaufwärts dieser Leserahmen und dem Fehlen der Trinukleotid-Sequenz GTC nicht eindeutig identifiziert werden. Da die Transkripte der hoch konservierten Bereiche der Genome der Viren SIRV1 und SIRV2 sowohl in ihrer Größe als auch in den enthaltenen Leserahmen sehr ähnlich sind, lässt dies darauf schließen, dass die Promotorregionen der Transkripte ebenfalls Ähnlichkeit aufweisen. Die Analyse der Promotorregionen der für SIRV2 postulierten Transkripte ergab, dass diese dieselben konservierten Elemente enthalten wie die Promotorregionen von SIRV1. Auch für die Promotorregionen der transkribierten SIRV2-spezifischen Leserahmen konnten TATA-Box-Motive und BRE-Elemente identifiziert werden. Darüberhinaus konnte in 65% der Fälle ebenfalls das GTC-Element unmittelbar stromabwärts der TATA-Box gefunden werden (Abb. 9).

```

SIRV1-ORF55a  GAGAAACTTTATATACTAGTTTATGCATATATAAGATTGGTGAATGAGAAATG
SIRV2-ORF83a  -----
SIRV1-ORF90a  GAGAAAGATTTTAAATAGAGAATACGAAATAAAAAATTGAGGCGAAAAATATG
SIRV2-ORF103a GAGAAACTTTAAATCTAATTTATGCATATGTAAAAGTGAGGTG
SIRV2-ORF109  AGAAAGATTTTAAATATGCGTTTTTATATATATGAAACGGTGAACTATAAATG
SIRV2-ORF131a GAGAAAGCTTTATATAGTAGTTTGACAAATATAATATTGGTGAAAAAAGAAATG
SIRV2-ORF111  ATGAAACATAAAAAATGTCATAAATCGAAACATATATCAGTGAAAAAGAAATG
SIRV2-ORF105a ATGAAATTTAAAAATGTCATAGTTTATCGAAATATAGTGAGGAAAAAATG
SIRV2-ORF102  ATCAATATTTAAAAATGTCATGTTTTCACAATAAATTATATG
SIRV1-ORF399  TGGTGACTTTATTTATGCTTTAGCAATTTAGCTAGCTTATG
SIRV2-ORF399  TTGAGTGTTTATTTATGCTTAGTAACCTTAGCTAGCTTATG
SIRV1-ORF56   AAAAAGATATAAAAAATGTCATAATTCAAAATCTTAAATGAGGAAAAATG
SIRV2-ORF56   AAAAAGATATAAAAAATGTCATAATCGGAAATCATAAAACAGAGAAAAATG
SIRV1-ORF131  AAAAAGATATAAAAAATGTCATAATTAAGATATTTTATAGGGGAAGAAACATG
SIRV2-ORF131b AAAAAGATATAAAAAATGTCATAATTAAGATATTTTATAGGCGGAAAAACATG
SIRV1-ORF81   AAAAAGATATAAAAAATGTCATAATATAAAATGTAAAAATAGAGAACATG
SIRV2-ORF84a  AAAAAGCTATAAAAAATGTCATAAATCAAAATGTAAAAATG
SIRV1-ORF158b TGGGAGATATAAATATGTCAGAAAGTAATAACTAAAACCTGAGAAAAAGATG
SIRV2-ORF158b TGGGAACATAAATATGTCAGAAACTGAAATAAGACTGATAAAATATG
SIRV1-ORF134  ACCTGAAAAATTTATTAAATTTAAAGAATAAAATTGATATTGACCAAAATGAC
SIRV2-ORF134  ACCTGAAATTTATTAAATTTGAAGAATAAAATTGATATTGACCAAAATATG
SIRV1-ORF55c  AATAGCATTTAAAAATGTCAAATCCAAATTTCTCCTTATG
SIRV2-ORF55   ACTACATTTAAAAATGTCAAATCAAAATTTCTCCTTATG
SIRV1-ORF335  AGTCAGCTTTATTTTTCATAATTTTATTTTATCTCATG
SIRV2-ORF335  ATTTAGCTTTATTTTTCATAATTTTATAGATTTCAAATTATG
SIRV1-ORF486  TTTGTAAATTTATTTTCTACTTGAGATATATAAATTGATAGCTATG
SIRV2-ORF488  -----
SIRV1-ORF154  CATAATGTATATAAATGTCATACATTATTGATTTAATAAATG
SIRV2-ORF154  GTATATGTATATAAATGTCATACAGTGCAATTTAATCTATG
SIRV1-ORF1070 TAGTAATGTATATAAATTTTGAAAAGAAACATTTTAAATCAATATG
SIRV2-ORF1070 TAGTAATGTATATAAATTTTGAAAAGAAACATTTTAAATCAATATG
SIRV1-ORF268  GTGACACTTTATTTTATGTCAGTTACTTATTAATAATGTATG
SIRV2-ORF269  GTGACACTTTATTTTATGTCAGTTACTTATTAATAATATATG
SIRV1-ORF209  TTTAAATTAATAATATGTCATATTGTTTAGAAATTATTATG
SIRV2-ORF176  TTTAAATTAATAATATGTCATATTGTTTAGAAATTATTATG
SIRV1-ORF95   AATAAGAAATATAAATGTCATAGAATTTTGGATTTTATAGAGATAGGTGAACAGGAAATG
SIRV2-ORF95   ATAAAGATATAAATGTCATAAAGTTTTCAAATTTTAGGTACAGGTGATTAAAGATATG
SIRV1-ORF241  ATAAAAATTTATAAATGTCATATACAGAAATGATAAATGGTGAAATAAATG
SIRV1-ORF75   ATAAAAATATAAATGTCATAATTTTATGAAAAATATGGGGAAAGAAAAATAGTTTTAAAGAAAGTAAAAAAATG
SIRV2-ORF73   ATAAAAATTTATAAATGTCATAGTTTATGAAATATTGAGGAGAGAAAAATAGTTTTAAAGAAAGTAAAAAAATATAGATTG
SIRV2-ORF108  ATAAAGATAAATATGTCATACTTATAGATTTTATTG
SIRV2-ORF105b GAGAAAGATTTTAAATAGAGAGTAATACGAAATAATATTGAGGCAAAAAAATG

```

Abbildung 9: DNA Sequenzen der Promotorregionen von SIRV1 und SIRV2. Mittels Primer Verlängerungsexperimenten kartierte Promotoren sind *kursiv* gekennzeichnet. Die übrigen Promotoren wurden anhand von Ähnlichkeit zu diesen bestimmt. Durch unterschiedliche Farben ist die jeweilige Position der TATA-Box (pink), des BRE-Elements (orange) und des GTC-Elements (grün) hervorgehoben. Die kartierten Transkriptionsstartpunkte sind mit einem Stern markiert.

Mittels biotinylierten Primern und PCR (s. Tab. 3) wurden je 10 µg DNA der Promotorsequenzen aus genomischer SIRV1-DNA amplifiziert und an die Streptavidinoberfläche superparamagnetischer Polystyrenkügelchen kovalent gebunden. In Gegenwart von 200 µg pUC18 Kompetitor-DNA wurden die immobilisierten Promotorsequenzen mit 1,4 mg Gesamtprotein aus *S. islandicus* REN2H1 Rohextrakt inkubiert. Nach magnetischer Separation und mehrfachem Waschen der Magnetkügelchen wurde an die Promotorsequenzen gebundenes Protein durch Erhöhung der Ionenstärke auf 380 mM NaCl eluiert. Das Eluat wurde zusammen mit dem Rohextrakt und den Waschfraktionen auf einem 15%igen SDS-Gel analysiert. Abb. 11 zeigt die mit dem Promotor des Leserahmens ORF56 von SIRV1 erzielte Reinigung eines einzelnen Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 14 kDa (Abb. 11: Spur 6). Die Ausbeute an gereinigtem Protein aus 1,4 mg Rohextrakt-Gesamtprotein betrug 750 ng (150 µl Eluat).

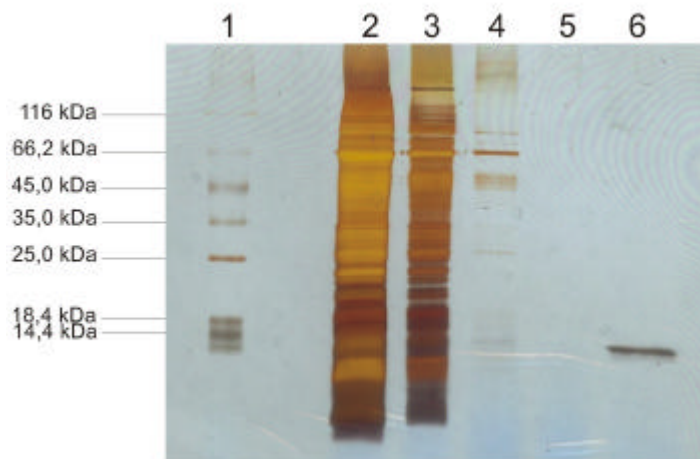


Abbildung 11: DNA Affinitätsreinigung des 14 kDa Proteins über den ORF56 Genpromotor von SIRV1. 15%iges SDS-Polyacrylamidgel nach Silberfärbung. 1: Molekularmassenstandards. 2: Rohextrakt. 3: Proteinüberstand nach Inkubation mit den DNA-Affinitätskügelchen. 4, 5: Waschfraktionen 6: Eluat.

Mit den verwendeten Promotorsequenzen der Leserahmen SIRV1-ORF134 und SIRV1-ORF 399 konnte aus dem *S. islandicus* Rohextrakt ebenfalls das 14 kDa große Protein gereinigt werden (Abb. 12). Auch bei Verwendung von Rohextrakt aus virusinfizierten Zellen wurde dasselbe Ergebnis erhalten (Abb. 12). Allerdings war die Ausbeute an gereinigtem Protein deutlich geringer, was durch die experimentell bedingte, etwas geringere eingesetzte Gesamtproteinmenge zu erklären ist. Um auszuschließen, dass trotz der eingesetzten Kompetitor-DNA eine zufällige Bindung an die angebotene DNA-Sequenz erfolgte, wurde zur Kontrolle der T6-Promotor des *Sulfolobus shibatae* Virus SSV als Zielsequenz eingesetzt. Der T6 Promotor enthält alle typischen Elemente eines *Sulfolobus*-Promotors und wird von den Komponenten der Transkriptionsmaschinerie des Wirtes gut erkannt. Eine Reinigung des 14 kDa Proteins konnte mit der T6-Promotorsequenz jedoch nicht erreicht werden, wodurch eine spezifische Bindung des 14 kDa Proteins an Sequenzelemente der Virus-Promotoren gezeigt werden konnte.

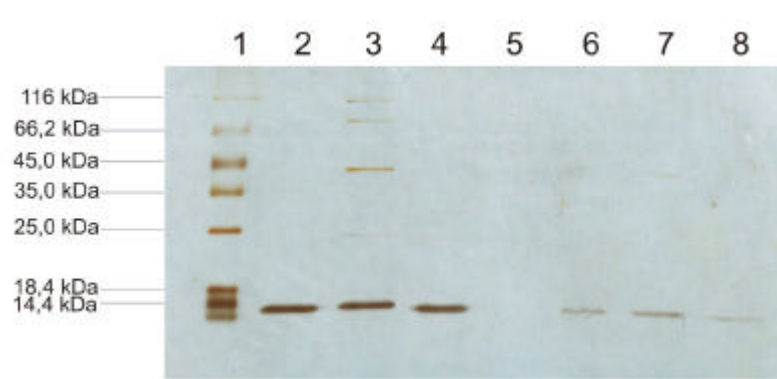


Abbildung 12: Reinigung des 14 kDa Proteins aus infiziertem und nicht infiziertem Rohextrakt über verschiedene Genpromotoren. 15%iges SDS-Polyacrylamidgel nach Silberfärbung. 1: Molekularmassenstandard, 2-5: über die Promotoren der ORFs 56 (2), 134 (3) und 399 (4) von SIRV1, sowie über den T6-Promotor (5) erhaltenes Protein aus Rohextrakt nicht-infizierter Zellen; 6-8: über die Promotoren der ORFs 56 (6), 134 (7) und 399 (8) erhaltenes Protein aus Rohextrakt aus SIRV1-infizierten Zellen.

Tabelle 3: Zur Amplifizierung der Promotorsequenzen verwendete Primerkombinationen

amplifizierter Promotor	Primerkombination
SIRV1-56	5547S1F/Bio 5679S1R
SIRV1-134	Bio 10964S1F/11276S1R
SIRV1-399	5034S1F/Bio 5367S1R
T6	BioT7Promotor/T6 revers

1.2 Untersuchung des 14 kDa Proteins im rekonstituierten *in vitro*-Transkriptionssystem von *Sulfolobus*

Um zu untersuchen, ob das über die Virus Promotoren gereinigte 14 kDa-Protein bei der Regulation der Transkription eine Rolle spielt, wurden Experimente im rekonstituierten basalen Transkriptionssystem von *Sulfolobus* durchgeführt. Das *in vitro*-System besteht aus rekombinantem TBP (TATA-Binde-Protein), TFB (Transkriptionsfaktor B) und hoch gereinigter RNA-Polymerase wurde entwickelt, um an der Regulation der Transkription von Archaeen beteiligte Proteine zu untersuchen (Bell *et al.*, 1999a; Bell und Jackson, 2000a; Bell *et al.*, 2002). Zur Untersuchung des 14 kDa-Proteins wurden drei unterschiedlichen Virus-Promotoren (56, 134 und 399, s. Abb. 10), sowie zur Kontrolle der T6-Promotor, in die Transkriptionsreaktionen eingesetzt. Die Reaktionen wurden jeweils ohne 14 kDa-Protein, sowie nach Zugabe von je 20 ng des nativ gereinigten Proteins durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt. Während die Menge des gebildeten Transkriptionsinitiationsproduktes, ausgehend vom T6-Promotor, nach Zugabe des 14 kDa-Proteins gleich bleibt, nimmt im Experiment mit dem Promotor 134 das Produkt nach Zugabe des 14 kDa-Proteins deutlich (um ein 3-faches) zu. Auch für den Promotor 56 konnte eine leichte Zunahme (um ca. $\frac{1}{3}$) des Initiationsproduktes in Gegenwart des 14 kDa Proteins beobachtet werden. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem aus *S. islandicus*-Rohextrakt gereinigten 14 kDa-Protein tatsächlich um einen Transkriptionsregulator handelt. Die Initiation der Transkription an einigen SIRV-Promotoren wird stimuliert. Im Fall des Promotors 399 konnte weder mit, noch ohne 14 kDa-Protein ein Transkriptionsinitiationsprodukt nachgewiesen werden.

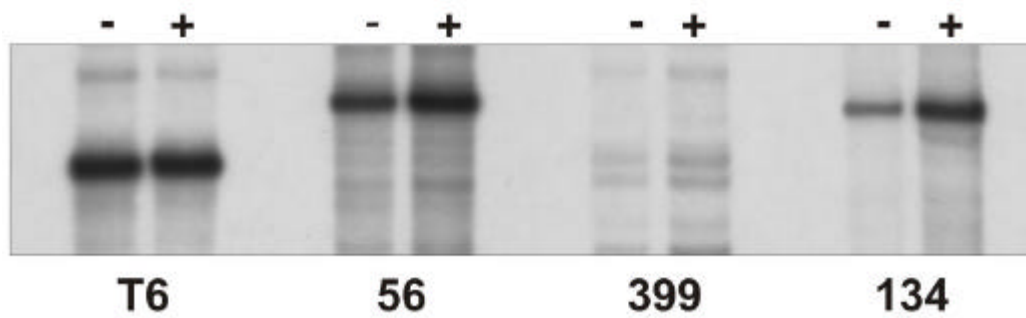


Abbildung 13: „Primer Extension“ Produkte der *in vitro* Transkriptionsreaktionen der Promotoren T6, 56, 399 und 134 auf einem 8%igem denaturierenden Polyacrylamidgel. Die Reaktionen wurde mit je 20 ng TBP, 20 ng TFB, 250 ng RNAPolymerase und entweder ohne oder nach Zugabe (-/+) von 20 ng gereinigtem 14 kDa Protein zum Reaktionsansatz durchgeführt.

Zur Überprüfung, ob die *in vitro*-Transkriptionsstartpunkte mit den *in vivo* ermittelten übereinstimmen, wurden die *in vitro*-Transkriptionsprodukte zusammen mit ihren Sequenzreaktionen, die mit denselben radioaktiv markierten Primern erhalten wurden, auf einem 8%igem Sequenzgel analysiert. In Abb. 14 ist exemplarisch das *in vitro* erhaltene Transkriptionsinitiationsprodukt ausgehend vom Promotor 134 und die daraus abgeleitete Promotorsequenz dargestellt. Ein Vergleich der Promotorsequenz mit der Promotorregion, die im „Primer-Extension“ Experiment identifiziert wurde (Abb. 9), bestätigt, dass der Transkriptionsstartpunkt *in vitro* und *in vivo* identisch sind.

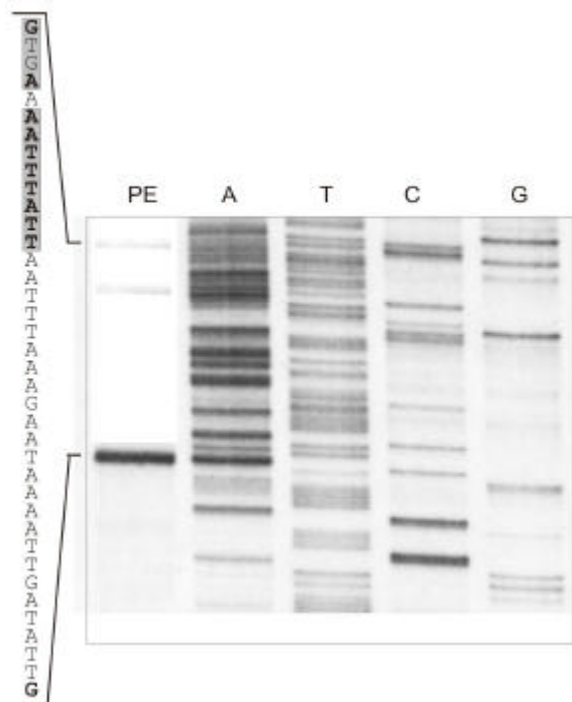


Abbildung 14: *In vitro*-Transkriptionsstartpunkt ausgehend vom Promotor 134. Das Primerverlängerungsprodukt [PE] wurde parallel zu seinen Sequenzreaktionen (T, A, G, C), die mit demselben radioaktiv markierten Primer ausgeführt wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die abgeleitete komplementäre Promotorsequenz ist neben dem Autoradiogramm angegeben. TATA-Box, BRE und GTC-Element sind durch fette Schrift und einen graue Schattierung markiert. Der Transkriptionsstart ist in fetter Schrift gekennzeichnet.

1.3 Identifizierung des 14 kDa Proteins mittels Massenspektroskopie und Sequenzdatenanalyse

Zur Bestimmung der Identität des gereinigten Transkriptionsfaktors (14 kDa Protein) wurde dieser massenspektroskopisch in Zusammenarbeit mit Dr. Stephen Bell und Dr. SewYeu Peak-Chew am MRC Laboratory of Molecular Biology, Mass Spectrometry Facility in Cambridge (England) untersucht. Die Aminosäuresequenzen von drei der erhaltenen Peptide stimmten mit dem für *Sulfolobus solfataricus* P2 annotierten Protein SSo0048 (She *et al.*, 2001) überein. SSo0048 wurde als mutmaßlicher Transkriptionsregulator annotiert, der starke Ähnlichkeit zum Transkriptionsfaktor Lrs14 von *S. solfataricus* zeigt. Die physiologische Bedeutung von Lrs14 ist nicht bekannt, allerdings konnte für das Protein eine Repressorfunktion am eigenen Genpromotor gezeigt werden (Bell und Jackson 2000a; Napoli *et al.*, 1999). Aufgrund der Ergebnisse der Sequenzdatenanalyse wurde das 14 kDa-Protein als Transkriptionsfaktor SSo0048 identifiziert.

1.4 Klonierung und heterologe Expression des Transkriptionsfaktors SSo0048

Um weitere Untersuchungen mit dem Transkriptionsfaktor SSo0048 durchführen zu können und größere Mengen an Protein zu erhalten, wurde das Protein in einen Vektor kloniert und heterolog in *E. coli* exprimiert. Mittels PCR wurde die für den Transkriptionsfaktor SSo0048 kodierende Sequenz von genomischer DNA aus *S. solfataricus* amplifiziert und Restriktionsschnittstellen eingeführt. Der Vorwärtsprimer 5'SSo0048 (s. II.1.3) wurde so konstruiert, dass er eine *Nde*I-Schnittstelle enthielt, wobei die Nukleotide ATG der *Nde*I-Schnittsequenz gleichzeitig als Start-Codon für die Proteintranslation dienten. Über den Rückwärtsprimer 3'SSo0048 (s. II.1.3) wurde unmittelbar nach dem Stop-Codon von SSo0048 eine *Xho*I-Schnittstelle eingefügt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde gereinigt, mit *Nde*I und *Xho*I hydrolysiert und in den mit denselben Restriktionsendonukleasen behandelten Expressionsvektor pET 30a kloniert. Der Ligationsansatz wurde in *Escherichia coli* XI 10 GoldTM transformiert. Mittels

Restriktionshydrolyse und Kolonie-PCR wurden die Transformanten auf das Vorhandensein der Insertionssequenz überprüft. Ein Insert-tragendes Plasmid wurde ausgewählt und zur endgültigen Kontrolle die Insertionssequenz des erhaltenen Expressionskonstrukts vollständig sequenziert.

Das erhaltene Plasmid wurde in den Expressionsstamm *Rosetta (DE3) pLysS* transformiert und ausgehend von einer Übernacht-Kultur die Expression des Proteins durchgeführt (s. II.8.2.2). Die Expression erfolgte bei 37°C im 1-l-Maßstab. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 min., 1 h, 2 h, 3 h und 4 h) nach Induktion der Expression wurden Proben genommen und auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 15). Vor der Induktion ist das rekombinante SSo0048 im *E. coli* Rohextrakt nicht zu identifizieren (Abb. 11: Spur 2). Nach 1 h Induktion ist deutlich eine SSo0048-Bande sichtbar, die bis zum Zeitpunkt 3 h nach der Induktion deutlich zunimmt und die maximale Überexpressionsrate erreicht.

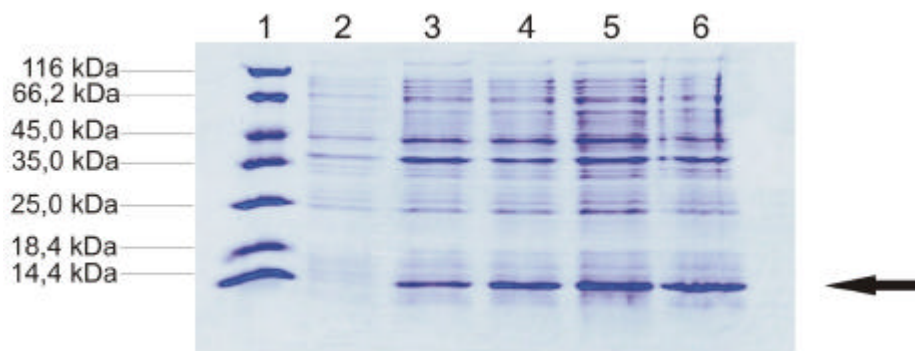


Abbildung 15: Expression von SSo0048 in *E. coli* Rosetta (*DE3*) *pLysS*. 15%iges SDS-Polyacrylamid Gel nach Coomassiefärbung. 1: Molekularmassenstandard; 2: Gesamtproteinfraktion vor der Induktion. 3-6: Gesamtproteinfraktion 1 h (3), 2 h (4), 3 h (5) und 4 h (6) nach der Induktion.

1.5 Reinigung des rekombinanten Transkriptionsfaktors SSo0048

Zur Reinigung von rekombinantem SSo0048 wurde die gewonnene Zellmasse aus 1 l Expressionskultur aufgearbeitet. Der Großteil der löslichen *E. coli*-Proteine konnte durch einen 30-minütigen Hitzeschritt bei 75°C entfernt werden. Das danach im Proteinüberstand stark angereicherte thermostabile rekombinante Protein konnte über eine Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose (s. II.8.3.3) gereinigt und stark aufkonzentriert werden. Bei der Überprüfung der Reinigung in einem 15%igem SDS-Polyacrylamidgel (Abb.16) konnte nach Coomassiefärbung keine Verunreinigung beobachtet werden (Abb. 16: Spur 6). Insgesamt wurden 6 mg rekombinantes SSo0048 Protein gewonnen.

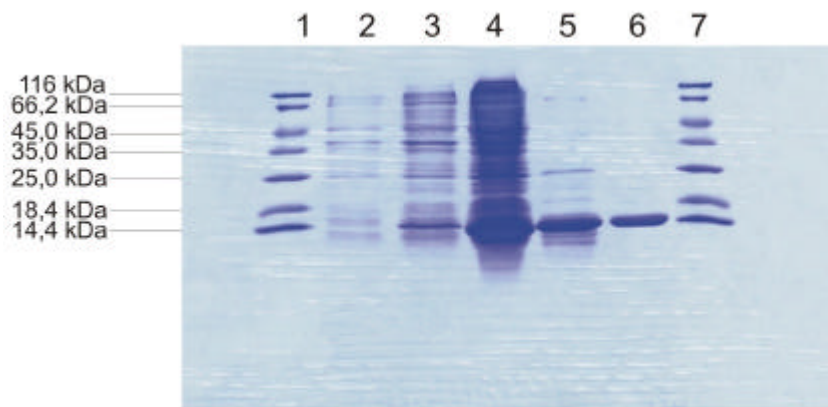


Abbildung 16: Reinigung des rekombinanten SSo0048 Proteins. 15%iges SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassiefärbung. 1, 7: Molekularmassenstandard, 2: Rohextrakt vor der Induktion. 3, 4: Rohextrakt nach 4 h Induktion. 5: hitzestabiler Proteinüberstand. 6: Protein nach Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose.

1.6 Untersuchung von SSo0048 im rekonstituierten *in vitro*-Transkriptionssystem von *Sulfolobus*

Zum Nachweis der Aktivität des rekombinant hergestellten Transkriptionsfaktors wurde das gereinigte Protein im rekonstituierten *in vitro*-Transkriptionssystem von *Sulfolobus* untersucht. Unterschiedliche Mengen des rekombinanten SSo0048 Proteins (0 ng, 20 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng und 1 µg) wurden dem Basalsystem, bestehend aus je 20 ng TBP und TFB, sowie 250 ng RNA-Polymerase, zugegeben. Als Matritze wurde zunächst der SIRV1-Genpromotor des ORF 134 eingesetzt, da dieser im Versuch mit dem nativ aus Rohextrakt gereinigtem Protein die deutlichsten Ergebnisse lieferte. Zur Kontrolle wurden die Versuche parallel mit dem SSV-T6-Promotor durchgeführt. In Abbildung 17 ist zu sehen, dass die Initiation der Transkription des ORF 134 Proteins durch Zugabe des rekombinant hergestellten Transkriptionsfaktors SSo0048 deutlich (um ein 4-faches) stimuliert wird. Dies ist ab einer Menge von 20 ng eingesetztem Protein zu beobachten. Eine weitere Zunahme der Intensität der Bande mit aufsteigender Proteinkonzentration konnte nicht beobachtet werden. Im Vergleich dazu wird die Transkription, ausgehend vom T6-Promotor, auch bei Zugabe großer Mengen des zu untersuchenden Proteins nicht beeinflusst.

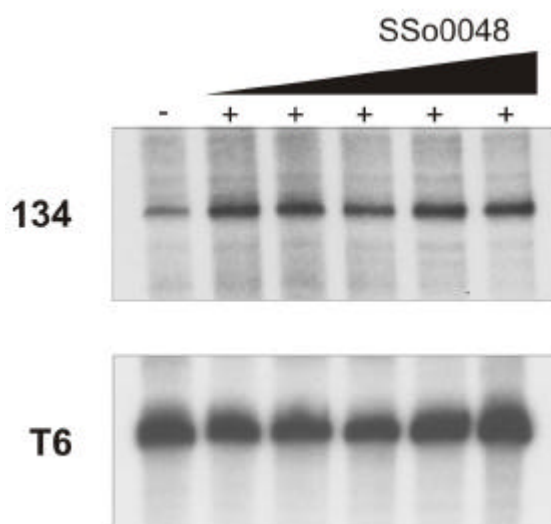


Abbildung 17: „Primer Extension“ Produkte der *in vitro* Transkriptionsreaktionen der Promotoren T6 und 134, auf einem 8%igen denaturierenden Polyacrylamidgel. Die Reaktionen wurde mit je 20 ng TBP, 20 ng TFB, 250 ng RNA-Polymerase und entweder ohne SSo0048 oder nach Zugabe (-/+) von 20 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng oder 1 µg rekombinantom SSo0048 zum Reaktionsansatz durchgeführt.

Weiterhin wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors auf die Transkription, ausgehend von den Promotoren 56 und 399, untersucht. Das Experiment wurde jeweils ohne SSo0048, sowie mit 500 ng SSo0048 Protein im Reaktionsansatz durchgeführt. Die größere Proteinmenge wurde gewählt, um zu überprüfen, ob eine hohe Proteinkonzentration die Transkription, ausgehend vom Promotor 399, aktivieren könnte. Allerdings zeigte sich auch in diesem Experiment dasselbe Ergebnis. Wie bisher konnte eine stimulierende Wirkung auf die Transkription ausgehend von den Promotoren 134 und 56 beobachtet werden, sowie kein Effekt im Fall des T6-Promotors und kein Initiationsprodukt für den Promotor 399 (Abb. 18).

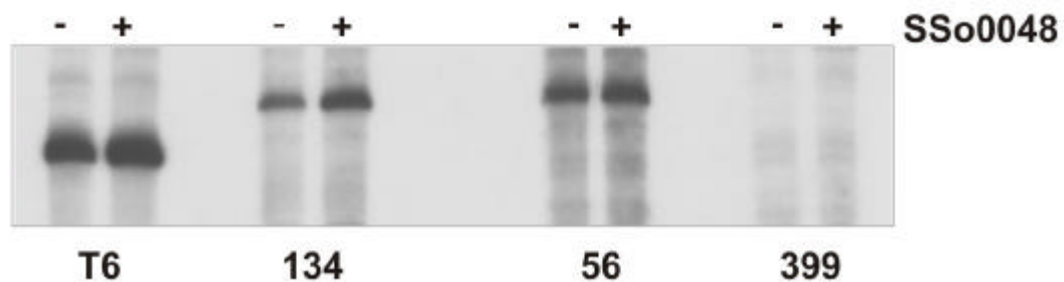


Abbildung 18: „Primer Extension“ Produkte der *in vitro* Transkriptionsreaktionen der Promotoren T6, 134, 56 und 399 auf einem 8%igen denaturierenden Polyacrylamidgel. Die Reaktionen wurden mit je 20 ng TBP, 20 ng TFB, 250 ng RNA-Polymerase und entweder ohne SSo0048 oder nach Zugabe (-/+) von 500 ng rekombinantem SSo0048 zum Reaktionsansatz durchgeführt.

Ob der stimulierende Effekt von SSo0048 ähnlich wie beim Transkriptionsfaktor TFE unter suboptimaler TBP-Konzentration verstärkt zu beobachten ist (Bell *et al.*, 2001), wurde in Reaktionen *in vitro* am Promotor des Leserahmens 134 in Abhängigkeit sinkender TBP Konzentrationen untersucht. In Abb. 19 ist das Autoradiogramm des Experimentes dargestellt. Die Abbildung zeigt deutlich, dass mit abnehmender TBP Menge die Intensität der Transkriptionsinitiationsprodukte abnimmt. Bei niedrigen TBP Konzentrationen von 5 ng bzw. 1 ng ist jedoch eine sehr starke Stimulation (6-fach bzw. 11-fach) zu beobachten. Ohne TBP im Ansatz erfolgt keine Initiation der Transkription. Dies zeigt, dass der Effekt des Transkriptionsfaktors SSo0048 von der Anwesenheit des TATA-Bindeproteins abhängig ist.

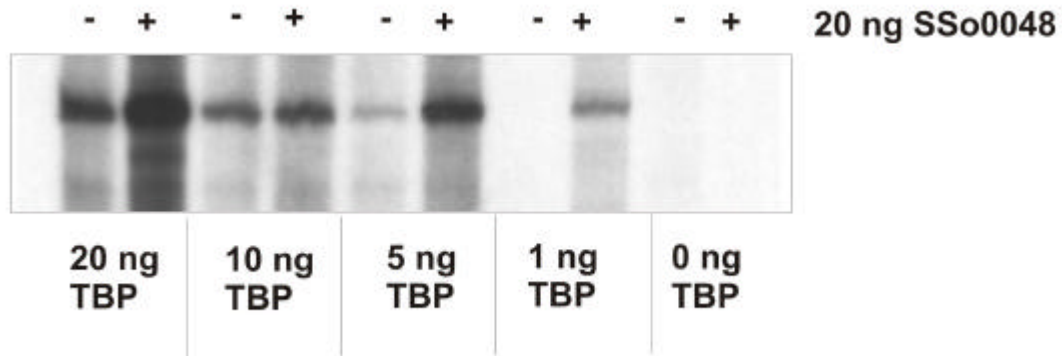


Abbildung 19: „Primer Extension“ Produkte der *in vitro* Transkriptionsreaktionen des Promotors 134 in Gegenwart unterschiedlicher TBP Mengen. Die Reaktionen wurde mit 20 ng TFB, 250 ng RNA-Polymerase, 20 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng oder 0 ng TBP und entweder ohne SSo0048 oder nach Zugabe (-/+) von 20 ng rekombinantem SSo0048 zum Reaktionsansatz durchgeführt.

1.7 Identifizierung der DNA-Bindestelle von SSo0048 durch DNase I-Footprinting

Mit der Promotoraffinitätsreinigung des Transkriptionsfaktors SSo0048 (14 kDa Protein) konnte gezeigt werden, dass das Protein spezifisch an die Promotorregionen der verwendeten Virus-Promotoren bindet. Sein stimulierender Effekt auf die Transkription einiger Promotoren konnte in *in vitro* Transkriptionsexperimenten gezeigt werden. Um den Bereich, in dem das gereinigte Protein an die Promotor-DNA bindet, genauer festzulegen und erste Hinweise auf einen Funktionsmechanismus zu erhalten, wurde ein DNase I-Footprinting durchgeführt. Über eine PCR-Reaktion mit dem Vorwärtsprimer 10964S1F und dem radioaktiv markierten Rückwärtsprimer 11276S1R (s. II.1.3) wurde die Promotorregion amplifiziert und als DNA-Template eingesetzt. Die DNA-Binde-Reaktion wurde ohne und mit 20 ng, 50 ng, 100 ng, 250 ng sowie 1 µg SSo0048 durchgeführt. Nach anschließender 1-minütiger DNase I-Behandlung wurden die Proben auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel zusammen mit einer entsprechenden Sequenzleiter analysiert (Abb. 20). Auf dem Autoradiogramm ist mit steigender Proteinmenge, im oberen Drittel des Gels, ein deutliches Verschwinden von DNA-Banden zu beobachten. Dies resultiert aus einer Protektion des entsprechenden Bereichs vor DNase I-Abbau durch gebundenes Protein. Anhand der Sequenzleiter und dem parallel dazu aufgetragenen Primerverlängerungsprodukt des Leserahmens 134 konnte die

Bindestelle identifiziert werden. Sie liegt im Bereich der Positionen von -9 bis -37 und -65 bis -114 stromaufwärts des Transkriptionsstarts (Abb. 20). Die Bindestelle überlappt zwischen den Position -9 und -37 mit der TATA-Box und dem BRE-Element und enthält an den Positionen -9 bis -12 und -18 bis -21 eine Palindromsequenz. Im weiter stromaufwärts gelegenen Bindebereich konnten ebenfalls Palindromsequenzen an den Positionen -77 bis -80 und -84 bis -87, sowie an den Positionen -95 bis -98 und -105 bis -108, identifiziert werden.

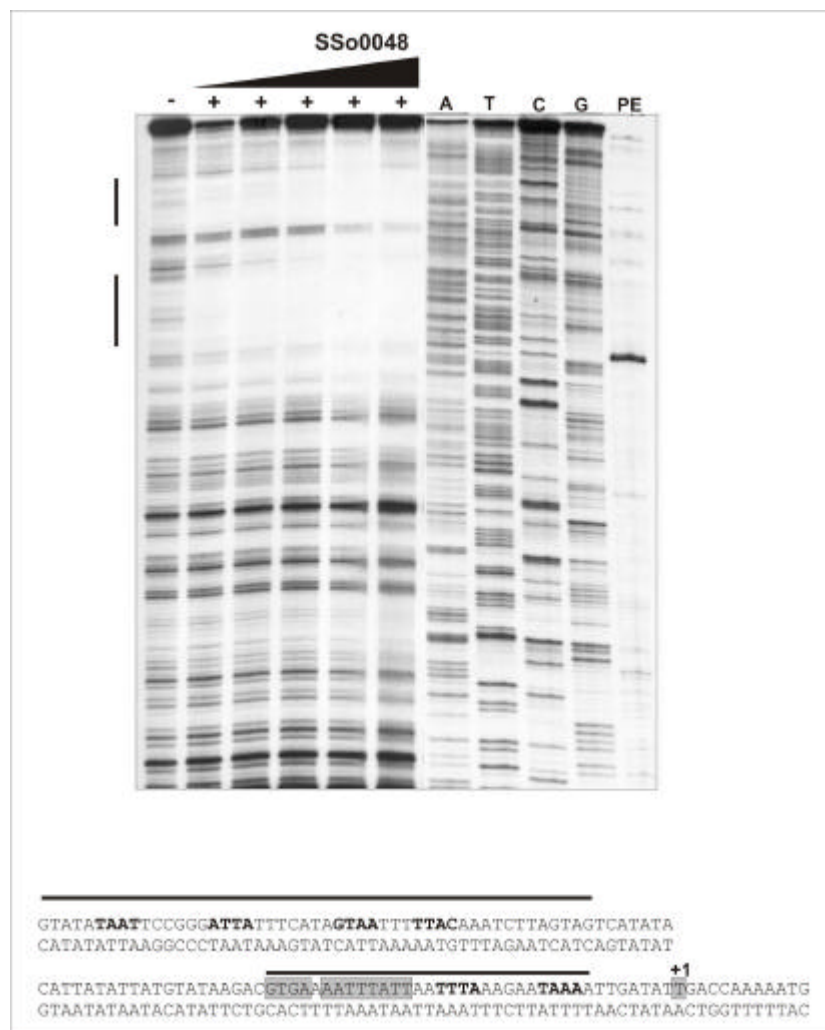


Abbildung 20: DNase I-Footprint des rekombinanten SSo0048 Proteins am SIRV1 ORF 134 Promotor. Die Reaktion wurde ohne bzw. mit (-/+) steigenden Mengen an SSo0048 Protein (0 ng, 50 ng, 100 ng, 250 ng, 500 ng, 1 µg) durchgeführt und zusammen mit den Sequenzreaktionen (A, T, C, G) des Templates und dem *in vitro*-Primerextensionprodukt [PE] des Promotors 134 elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bereiche der DNase-Protektion sind am Autoradiogramm sowie in der schematischen Darstellung des Sequenzabschnittes durch zwei fette Linien gekennzeichnet. TATA-Box, BRE-Element und Transkriptionsstart sind grau hinterlegt. Gegenläufige Wiederholungssequenzen sind fett gekennzeichnet.

2. Untersuchungen am viruscodierten ORF 56-Protein (P56)

Während der Kartierung der Transkripte der Rudiviren SIRV konnte für den Leserahmen ORF 56 ein kleines, stark präsent, separates Transkript beobachtet werden. Die abgeschätzte Größe des entsprechenden hypothetischen Proteins beträgt 6,5 kDa. Aufgrund der geringen Größe ist es denkbar, dass es sich hierbei möglicherweise um ein kleines regulatorisches Protein handelt. Sequenzhomologie zu bisher beschriebenen Sequenzen konnte nicht gefunden werden. Allerdings zeigte sich bei der Sequenzanalyse, dass das Protein ein für DNA-Bindeproteine typisches Helix-Turn-Helix Motiv aufweist. Um das hypothetische Protein genauer zu untersuchen, wurde es heterolog in *E. coli* exprimiert und in DNA-Bindestudien untersucht.

2.1 Klonierung und heterologe Expression des ORF 56-Proteins

Zunächst wurde das ORF56-Gen in den Expressionsvektor pET 30a, wie für den Transkriptionsfaktor SSo0048 beschrieben, einkloniert (s. III.B.1.4), ebenso die entsprechenden Restriktionsschnittstellen. Der Vorwärtsprimer ORF 56 F (s. II.1.3) enthielt ebenfalls eine *NdeI*-Schnittstelle, wobei auch hier die Schnittsequenz ATG zugleich als Startcodon diente. Der Rückwärtsprimer ORF 56 R enthielt unmittelbar nach dem Stoppcodon eine *XhoI*-Schnittstelle, über die das aus genomischer SIRV1-DNA amplifizierte Gen in den Vektor ligiert wurde. Nach Transformation des Expressionskonstrukts in *Escherichia coli* *XL 10 GoldTM* wurden Insert-tragende Transformanten mittels Kolonie-PCR und Restriktionshydrolyse ermittelt. Die Plasmidinsertionssequenz wurde zur abschließenden Kontrolle vollständig sequenziert. Zur Expression wurde das Konstrukt in den Expressionsstamm *E. coli* *Rosetta (DE3) pLysS* transformiert und unter den gleichen Bedingungen, wie für den Transkriptionsfaktor SSo0048 beschrieben, überexprimiert. Das sehr kleine, nur 6,5 kDa große Protein wurde bei den ausgewählten Bedingungen (Inkubationstemperatur: 37°C) bereits 1 h nach der Induktion vollständig überexprimiert (Abb. 21).

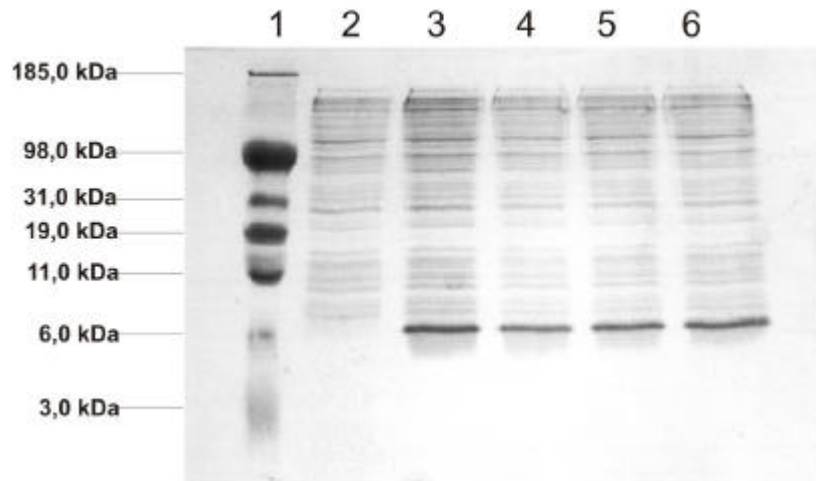


Abbildung 21: Expression des ORF 56-Proteins in *E. coli* Rosetta (*DE3*) *pLysS*. 19,5%iges SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassiefärbung. 1: Molekularmassenstandard. 2: Gesamtproteinfraktion vor der Induktion. 3-6: Gesamtproteinfraktion 1 h (3), 2 h (4), 3 h (5) und 4 h (6) nach der Induktion.

2.2 Reinigung des rekombinanten ORF 56-Proteins

Zur Reinigung wurden Zellen aus 1 l Expressionskultur aufgearbeitet. Nach dem Zellaufschluss wurden die unlöslichen Proteinkomponenten zunächst durch Zentrifugation entfernt. Ein Hitzeschritt für 30 Minuten bei 75°C ermöglichte die Abtrennung einer Vielzahl der *E. coli*-Proteine und eine gleichzeitige Anreicherung des hitzestabilen ORF 56-Proteins (Abb. 22). Nach abschließender Reinigung mittels Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose durchgeführt konnten 30 µg rekombinantes ORF56-Protein gewonnen werden.

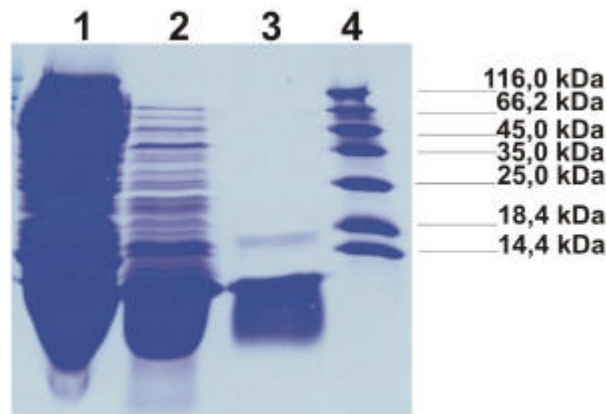


Abbildung 22: Reinigung des rekombinanten ORF 56-Proteins. 19,5%iges SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassiefärbung 1: Rohextrakt nach 4 h Induktion. 2: Hitzestabiler Proteinüberstand. 3: Protein nach Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose. 4: Molekularmassenstandard.

2.3 DNA-Bindungsstudien mit rekombinant hergestelltem ORF 56-Protein

2.3.1 Nachweis der DNA-Bindungseigenschaft des ORF 56-Proteins

Mittels Gel-Verzögerungstests wurde die Bindung des ORF56-Proteins an Promotor-DNA untersucht. Während der *in vivo*-Transkriptionsanalyse zeigte sich, dass sich im Bereich stromaufwärts des ORF 56-Gens eine im Vergleich zum restlichen Genom eine relativ große, nicht kodierende, intergenische Region befindet, die für die Bindung regulatorischer Elemente eine Rolle spielen könnte. Zusätzlich konnte in der Promotorregion des ORF 56-Gens ein palindromisches Sequenzmotiv („inverted repeats“) identifiziert werden, das als mögliche Bindestelle für Regulatorelemente fungieren könnte. Um die mögliche Bindung des ORF 56-Proteins an seinen eigenen Promotor zu untersuchen, wurde mittels PCR ein radioaktiv markiertes 150 bp langes doppelsträngiges DNA-Fragment hergestellt, welches von der Promotorregion über die gegenläufige Wiederholungssequenz („inverted repeats“) bis in die intergenische Region hineinreicht (Abb. 23).

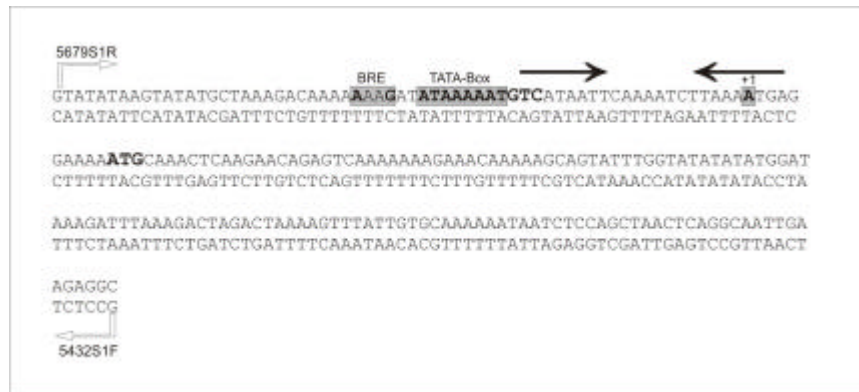


Abbildung 23: Schematische Darstellung des im Gel-Verzögerungstest eingesetzten SIRV 1 DNA-Fragments. TATA-Box, BRE-Element und Transkriptionstart sind durch fette Schrift gekennzeichnet und grau hinterlegt. Das Startcodon ist ebenfalls in fester Schrift markiert. Die beiden schwarzen Pfeile geben den Bereich der indirekten Wiederholungssequenz an. Die abgewinkelten Pfeile deuten die zur Amplifikation verwendeten Primer und deren jeweilige Position an.

Nach 15-minütiger Inkubation des DNA-Fragments bei 48°C mit unterschiedlichen Mengen an ORF 56-Protein (0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 100 ng) konnte mit Zunahme der Proteinkonzentration ein verändertes Laufverhalten des DNA-Fragments im nativen Polyacrylamidgel beobachtet werden. Wie in Abb. 24 gezeigt, blieb das Laufverhalten bis zu einer Menge von 5 ng an eingesetztem Protein unverändert. Ab einer Menge von 10 ng an eingesetztem Protein konnte eine erste Retardation beobachtet werden, die bei 100 ng zugegebenem Protein vollständig zu beobachten war. Die schrittweise Retardation des DNA-Fragments bei 10 und 20 ng eingesetztem Protein spricht für eine kooperative Bindung des Proteins an die DNA.

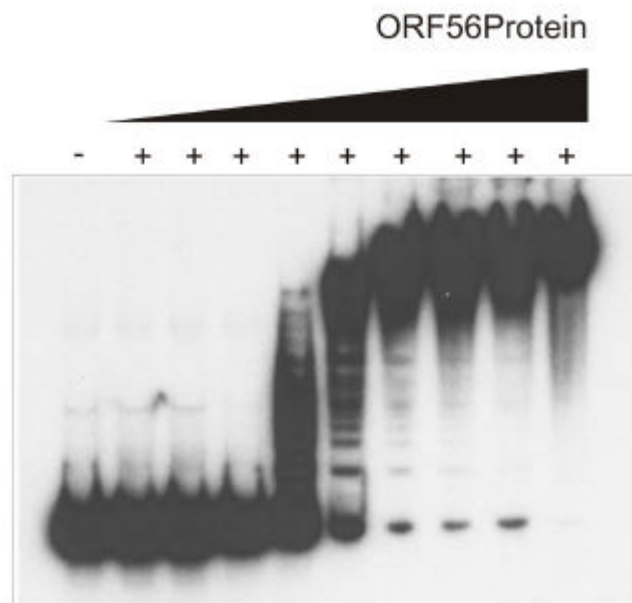


Abbildung 24: Nachweis der DNA-Bindung des ORF 56-Proteins. 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 oder 100 ng (-/+) Protein wurden für 15 min. bei 48°C mit dem SIRV1 DNA-Template inkubiert und auf einem 5%igem nativen Polyacrylamidgel analysiert.

2.3.2 Nachweis der sequenzspezifischen Bindung des ORF 56-Proteins

Um eine spezifische Bindung des Proteins nachzuweisen, sowie den Bereich der „inverted repeats“ im Genpromotor von ORF 56 als postulierte Bindestelle zu untersuchen, wurde ein nur 36 bp langes DNA-Template in das Bindeexperiment eingesetzt (Abb. 25).

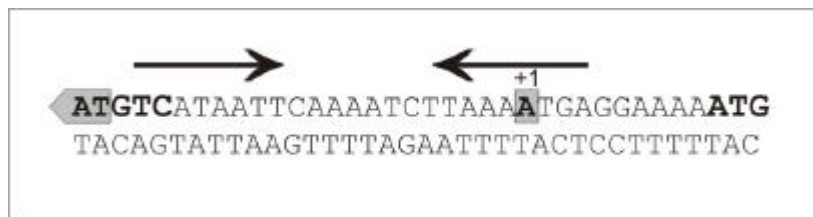


Abbildung 25: Schematische Abbildung des im Nachweis zur spezifischen Bindung eingesetzten SIRV1 DNA-Templates. Darin enthaltene Basen der TATA-Box, sowie der Transkriptionsstart sind durch fette Schrift und graue Schattierung bzw. einen grauen Pfeil gekennzeichnet. GTC-Element und Startcodon sind in fetter Schrift hervorgehoben. Der Bereich der gegenläufigen Wiederholungssequenz („inverted repeat“, IR) ist durch die beiden schwarzen Pfeile markiert.

Dazu wurden im entsprechenden Sequenzbereich die zueinander komplementären Oligonukleotide IR56F und IR56R (s. II.1.3) konstruiert, gegeneinander hybridisiert und schließlich mit ^{32}P radioaktiv markiert. Nach Inkubation des DNA-Fragments (0,02 pmol) mit unterschiedlichen Mengen des ORF 56-Proteins (0 ng, 20 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng und 1 μg), wurde sein Laufverhalten, in Gegenwart von 10 fachem Überschuss an Poly [dl, dC] als unspezifischer Kompetitor, in einem nativen Polyacrylamidgel untersucht. Trotz des Kompetitors Poly [dl, dC] konnte ab einer eingesetzten Menge von 20 ng (0,15 μM) ORF 56-Protein ein verzögertes Laufverhalten beobachtet werden (Abb. 26). Ein erster Hinweis für eine spezifische Bindung konnte somit erhalten werden.

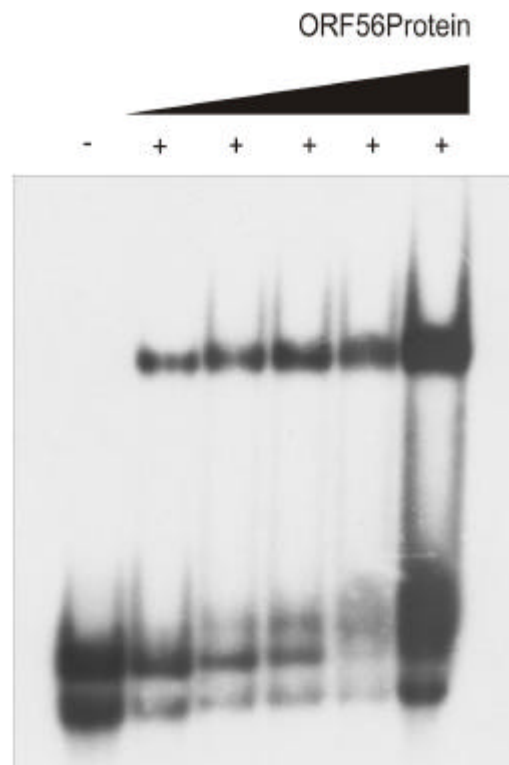


Abbildung 26: Nachweis der spezifischen Bindung des ORF 56-Proteins an die „inverted repeat“ Region des eigenen Genpromotors. Bindereaktion ohne bzw. mit (-/+) 20 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng oder 1 µg (0,15-7,5 µM) ORF 56-Protein in Gegenwart von je 10-fachem Überschuss (1 µg) an Poly [dI, dC].

In einem Kontrollexperiment wurden neben dem unspezifischen Kompetitor Poly [dI, dC] zusätzlich steigende Mengen (0,05, 0,25, 0,5, 5, 25 und 50 pmol) nicht radioaktiv markiertes DNA-Template als spezifischer Kompetitor dem Ansatz zugegeben. Wie Abb. 27 veranschaulicht, ist die Retardation mit zunehmender Menge an spezifischem Kompetitor rückläufig. Dies zeigt, dass die Bindung des ORF 56-Proteins an die Template-DNA spezifisch ist.

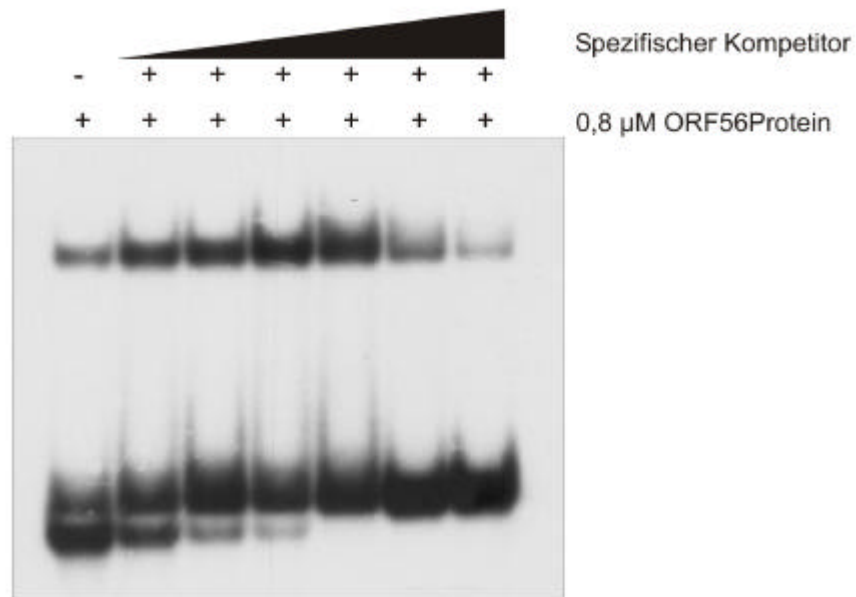
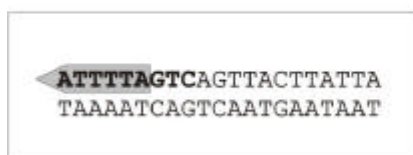


Abbildung 27: Nachweis der spezifischen Bindung des ORF 56-Proteins an die „inverted repeat“ Region des eigenen Genpromotors. Bindereaktion bei 0,8 µM ORF 56-Protein an 0,02 pmol radioaktiv markiertes DNA-Template ohne bzw. mit (-/+) 0,05, 0,25, 0,5, 5, 25 und 50 pmol nicht markierter Template-DNA in Gegenwart von je 10-fachem Überschuss (1 µg) an Poly [dI, dC].

Um in einem weiteren Experiment die Spezifität des ORF 56-Proteins an die eigene Promotorregion nochmals zu bestätigen bzw. eine mögliche Bindung an andere Virus-Promotoren zu untersuchen, wurden Bereiche der Genpromotoren ORF 209 und ORF 154 von SIRV1 (Abb. 28), die ebenfalls mittels „Primer Extension“-Analyse identifiziert wurden, im Bindeassay untersucht.

Matritze 209



Matritze 154



Abbildung 28: Schematische Abbildung der im Gel-Verzögerungstest eingesetzten DNA-Templates 209 und 154. Darin enthaltene Basen der TATA-Box sind mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet. GTC-Element und Startcodon sind in fetter Schrift hervorgehoben.

Zur Herstellung der doppelsträngigen DNA-Templates (Abb. 28) wurden die zueinander komplementären Oligonukleotide Pro209F und Pro209R bzw. die Oligonukleotide Pro154F und Pro154R (s. II.1.3) gegeneinander hybridisiert und anschließend radioaktiv markiert. Wie in den bisherigen Experimenten wurde eine spezifische Bindung des ORF 56-Proteins an die angebotenen DNA-Zielsequenzen bei steigender Proteinkonzentration (0,15-7,5 μ M) in Gegenwart von 10-fachem Überschuss des unspezifischen Kompetitors Poly [dl, dC] überprüft. Wie in Abb. 29 gezeigt, wurde für keine der beiden angebotenen DNA-Sequenzen eine Bindung/Retardation beobachtet, was die hochspezifische Bindung des ORF 56-Proteins an seine eigene Promotorregion bestätigt und eine nur generell höhere Affinität zu SIRV-DNA ausschließt.

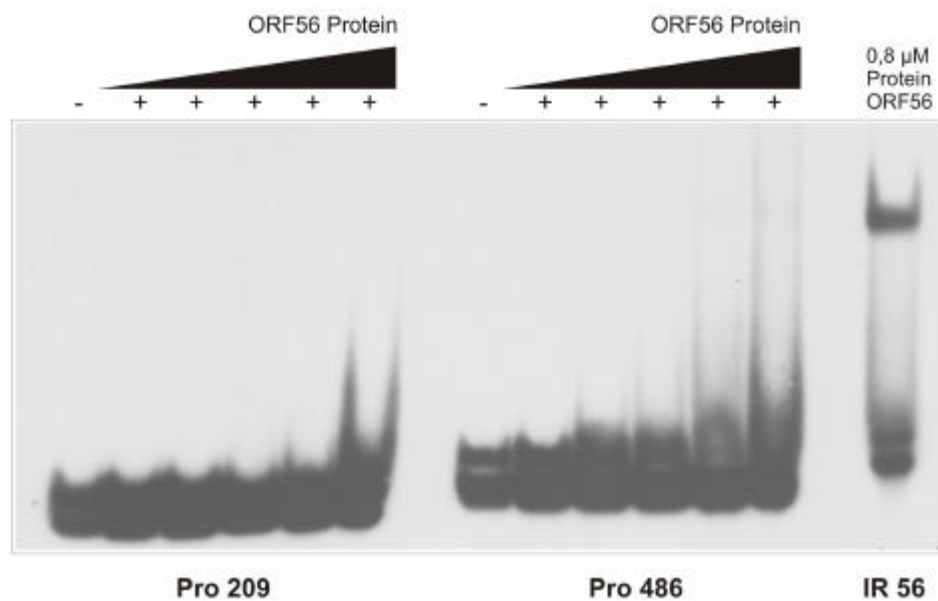


Abbildung 29: Gel-Verzögerungstest der Bindung des ORF 56-Proteins an Bereiche der Promotoren 209 und 154. Die Bindereaktion wurden jeweils ohne ORF 56-Protein bzw. mit (-/+) 20 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng oder 1 μ g ORF 56-Protein in Gegenwart von je 1 μ g Poly [dl, dC] als unspezifischer Kompetitor durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde eine Bindereaktion von 100 ng ORF 56-Protein an die IR Region des ORF 56-Promotors in Gegenwart von 1 μ g Poly [dl, dC] durchgeführt.

2.4 Untersuchung des ORF 56-Proteins im rekonstituierten *in vitro*-Transkriptionssystem von *Sulfolobus*

Um zu überprüfen, ob sich die spezifische Bindung des ORF 56-Proteins an den eigenen Genpromotor auf die Transkription des Gens auswirkt, wurde das rekombinante ORF 56-Protein im rekonstituierten *in vitro*-Transkriptionssystem von *Sulfolobus* untersucht. Zur Durchführung der Transkription wurden je 100 ng ORF 56-Promotorplasmid mit je 20 ng TBP und TFB, sowie 250 ng RNA-Polymerase und 0 ng, 20 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng oder 1 µg ORF 56-Protein für 20 min. bei 70°C inkubiert. Die dabei synthetisierte RNA wurde anschließend über eine sekundäre Primer-Verlängerungsreaktion mit einem radioaktiv markierten Primer in Form von DNA nachgewiesen. Unter den gewählten Bedingungen konnte kein deutlicher Effekt des Proteins auf die Transkription ausgehend vom Promotor des ORFs 56 nachgewiesen werden (Abb. 30). Eine densitometrische Quantifizierung des Autoradiogramms ergab eine minimale Zunahme der Bandenintensität um höchstens 10%.

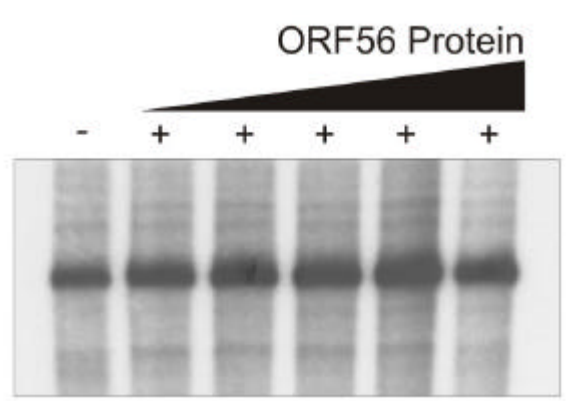


Abbildung 30: *In vitro*-Transkriptionsprodukte ausgehend vom Promotor 56. Die Reaktionen wurden in Gegenwart von je 20 ng TBP, 20 ng TFB, 250 ng RNA-Polymerase und jeweils ohne ORF 56-Protein bzw. mit (-/+) 20 ng, 50 ng, 100 ng, 500 ng oder 1 µg im Ansatz durchgeführt.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, ob das ORF 56-Protein möglicherweise in Kombination mit dem Transkriptionsfaktor SSo0048 Auswirkungen auf die Transkription verschiedener Promotoren zeigt. Dazu wurde mit den Promotoren T6, 134, 56 und 399 ein *in vitro* Transkriptionsexperiment unter den bisher beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Zusätzlich zu den Standardkomponenten (TBP, TFB, RNA-Polymerase) wurden je 50 ng oder 100 ng des rekombinant gereinigten Transkriptionsfaktors SSo0048 und des ORF 56-Proteins im Verhältnis 1:1 zugegeben. Wie das unten abgebildete Autoradiogramm (Abb. 31) zeigt, konnte unter diesen Bedingungen keine wesentliche Veränderung der bisher erhaltenen Ergebnisse beobachtet werden. Die gleichzeitige Zugabe beider rekombinant hergestellten Proteine führt unter den gewählten Bedingungen zwar zu einer Stimulation der Transkription, ausgehend von den Promotoren der Leserahmen 56 und 134. Allerdings konnte im Vergleich zum ORF56 unabhängigen Experiment (§. III.B.1.2 und III.B.1.6) keine wesentliche Änderung der Intensitätszunahme beobachtet werden. Die Transkription vom Promotor 399 konnte auch unter diesen Bedingungen nicht initiiert werden. Im Fall der Transkription ausgehend vom T6-Promotor bleibt dieser wie bisher weitgehend unbeeinflusst.

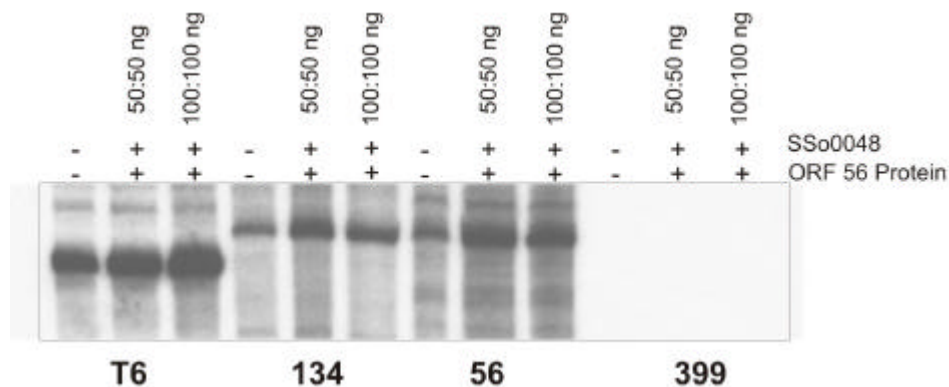


Abbildung 31: *In vitro*-Transkriptionsprodukte der Promotoren T6, 134, 56 und 399. Die Reaktionen wurden in Gegenwart von je 20 ng TBP, 20 ng TFB, 250 ng RNA-Polymerase und ohne bzw. mit (-/+) je 50 ng oder 100 ng des rekombinant gereinigten Transkriptionsfaktors SSo0048 und des ORF 56-Proteins im Verhältnis 1:1 im Ansatz durchgeführt.

3. Untersuchung der Virus-Gesamtproteinfraktion im rekonstituierten *in vitro*-Transkriptionssystem von *Sulfolobus*

Um zu untersuchen, ob im Viruspartikel Proteine enthalten sind, die während der Infektion mit in die Zelle gelangen und die Transkription beeinflussen, wurde von SIRV1 das Gesamtprotein präpariert und im *in vitro*-Transkriptionsexperiment untersucht. Für die Proteinpräparation wurden 0,5 ml dialysiertes Viruspräparat (s. II.7.1.2) mit einer p.f.u von 1×10^{11} für 1 h bei Raumtemperatur mit 0,1% Triton X100 behandelt und anschließend der Gesamtproteingehalt nach Bradford bestimmt. Den Standardkomponenten eines *in vitro* Transkriptionsansatzes wurde jeweils 1 μ g Virusproteinmischung zugegeben und mit der Reaktion ohne Virusprotein verglichen. Untersucht wurde die Transkription von den Promotoren T6, 134, 56 und 399. Dabei zeigte sich für den Promotor 134 eine leichte und für den Promotor 56 eine deutliche Verminderung des Transkriptions-initiationsproduktes. Der T6-Promotor blieb wie bisher weitgehend unbeeinflusst. Für den Promotor des Leserahmens 399 konnte wieder keine Initiation der Transkription nachgewiesen werden (Abb. 32). Beim Versuch, größere Mengen an Virusprotein im Versuch einzusetzen (5 μ g und 10 μ g), zeigte sich, dass sehr hohe Proteinkonzentrationen im Laufe der Reaktion eine quantitative Isolierung der gebildeten RNA störten, womit die sekundären reversen Transkriptionsreaktionen nicht miteinander verglichen werden konnten.

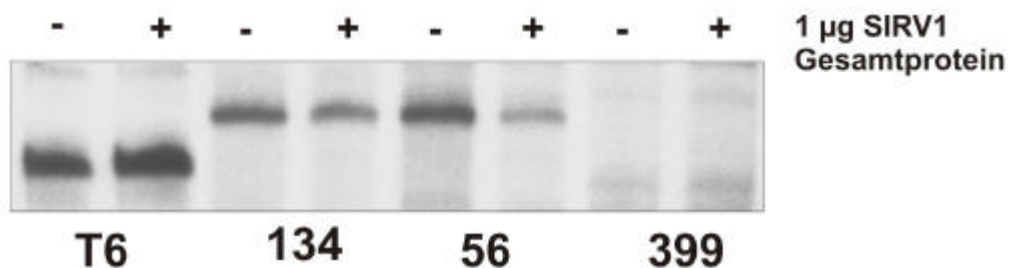


Abbildung 32: *In vitro*-Transkriptionsprodukte der Promotoren T6, 134, 56 und 399. Die Reaktionen wurden in Gegenwart von je 20 ng TBP, 20 ng TFB, 250 ng RNA-Polymerase und ohne bzw. mit (-/+) 1 μ g SIRV1-Gesamtproteinfraktion im Ansatz durchgeführt.

IV. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine detaillierte Untersuchung der Transkription der Genome von Viren der Crenarchaeota in Abhängigkeit des Infektionszyklus vorgenommen. Als Modellsysteme dienten die stäbchenförmigen Rudiviren SIRV1 und SIRV2. Das allgemeine Bild der Transkription der Genome dieser Viren unterscheidet sich wesentlich von dem doppelsträngiger DNA-Viren der Euryarchaeota, Bakteria und Eukarya. Während man dort, wie zum Beispiel beim Phagen HF2 von *Halorubrum* (Tang *et al.*, 2002), den Phagen T4 oder Lambda von *E. coli* (Miller *et al.*, 2003; Mosig; 1999; Campell, 1999) oder bei den eukaryontischen Papillomaviren (Warzenviren) oder Herpes Viren (zusammengefasst in Modrow *et al.*, 2003; Flint *et al.*, 2004) beobachtet, dass die Transkription der Gene einer zeitlichen Kontrolle unterliegt und in Kaskaden erfolgt, ist dies im Fall der Rudiviren SIRV1 und SIRV2 nicht gegeben. Bei diesen sind bereits 30 Minuten nach der Infektion, zum frühesten Zeitpunkt, zu dem Transkripte detektiert werden konnten, bis auf eine Ausnahme (ORF 55 bzw. 55c) alle Leserahmen transkribiert. Zwar können einige wenige Transkripte zu späteren Zeitpunkten beobachtet werden, es handelt sich dabei jedoch um monocistronische Transkripte einzelner Leserahmen oder Teile eines Operons, die bereits zu einem früheren Zeitpunkt in Form eines längeren polycistronischen Transkripts gebildet wurden. Das Argument, dass es sich in diesen Fällen einfach nur um prozessierte RNA handeln könnte, kann zumindest in den Fällen entkräftet werden, in denen sich für die monocistronischen Transkripte auch Promotorregionen identifizieren lassen. Das eher einheitliche Transkriptionsmuster der Viren SIRV1 und SIRV2 über den gesamten Replikationszyklus hinweg steht im Einklang mit der charakteristischen Interaktion der Rudiviren mit ihren Wirten. Das Vorliegen in Form eines stabilen Trägerzustandes innerhalb der Wirtszelle (Prangishvili *et al.*, 1999) scheint offensichtlich keine derart ausgeprägte Kontrolle der Transkription zu erfordern, wie sie bei Bakteriophagen beobachtet wird (Mosig, 1999). Ob es sich dabei im Hinblick auf die Evolution lediglich um einen wenig entwickelten Mechanismus handelt, oder um eine Methode, um den Trägerzustand aufrechtzuerhalten und ein langsames Ausschleusen der neu gebildeten Viren in eine extreme Umgebung (Temperatur: 80°C, pH 3,5) zu ermöglichen, bleibt spekulativ.

Im Laufe der Kartierung der Transkripte kristallisierten sich zwei Bereiche heraus, an denen eine Regulation der Transkription zu erwarten ist. Dabei handelt es sich um die langen intergenischen Bereiche zwischen den Leserahmen 56 und 131(b) und zwischen 158b und 134. Ausgehend von diesen Regionen wird zusätzlich zu den frühen polycistronischen RNAs, später im Infektionszyklus, die Transkription einzelner Gene initiiert. Der Übergang vom polycistronischen Transkript zu einem monocistronischen erfordert Mechanismen, die eine Termination der Transkription nach dem separat zu transkribierenden Gen ermöglichen. Im Fall des Strukturprotein-Gens 134 könnte eine Termination der Transkription unmittelbar nach dem Gen mit dem Genprodukt des nachfolgenden kleinen Leserahmens 55 (55c) des Gegenstranges in Zusammenhang stehen. Dieses Genprodukt könnte als Antisense-RNA fungieren, die die Termination unterstützt. Zusätzlich zur späten Transkription des Leserahmens 55 (55c) und der späten Bildung des monocistronischen Transkripts des Strukturproteingens konnte deutlich eine verstärkte Transkription des letzteren beobachtet werden (s. III.A.2). Dies lässt einen zusätzlichen positiven Regulationsmechanismus vermuten. Für eine solche Hypothese spricht außerdem, dass sich im langen nicht kodierenden Bereich stromaufwärts des Leserahmens 134 zahlreiche direkte und gegenläufige Wiederholungssequenzen identifizieren lassen, die als mögliche Bindestellen für regulatorische DNA-Bindeproteine fungieren könnten. Eine im Laufe des Replikationszyklus späte Induktion der Strukturproteinsynthese erscheint sinnvoll. Das massive Auftreten des separaten Transkripts des Strukturproteins 3 h nach der Infektion für SIRV1 und 2 h für SIRV2 korreliert gut mit dem Auftreten erster Viruspartikel in der Zelle (4 h nach der Infektion für SIRV1 und etwa 2,5 h für SIRV2). Eine Anhäufung von Strukturprotein in der Wirtszelle könnte die Assemblierung der Viruspartikel, welche lediglich aus doppelsträngiger DNA und Untereinheiten des Strukturproteins bestehen, induzieren. Auch im intergenischen Bereich zwischen den Leserahmen 56 und 131(b) lassen sich Hinweise für die Beteiligung regulatorischer Proteine finden. Im Promotorbereich des ORF 56 findet sich eine ausgeprägte gegenläufige Wiederholungssequenz, wobei es sich um die Binderegion eines regulatorischen Elements handeln könnte. Ein möglicher Kandidat für ein regulatorisches Protein ist dabei das vom ORF 56 kodierte Protein selbst. Das Gen wird über den kompletten Infektionszyklus stark in Form eines separaten Transkripts transkribiert. Das wahrscheinliche Protein ist mit einer abgeschätzten Größe von lediglich ca. 6,5 kDa äußerst klein und enthält ein für

DNA-Bindeproteine typisches Helix-Turn-Helix Motiv. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Protein des Leserahmens ORF 56 heterolog in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden (s. III.B.2.1 und III.B.2.2). Während der Reinigung zeigte das Protein eine ausgeprägte Affinität zu Heparin, was die Hypothese, dass es sich dabei um ein DNA-Bindeprotein handeln könnte, zusätzlich unterstützt. In ersten Gel-Verzögerungstests mit dem rekombinant hergestellten Protein konnte gezeigt werden, dass es sich beim ORF 56 Protein tatsächlich um ein DNA-Bindeprotein handelt (s. III.B.2.3). In *in vitro*-Untersuchungen im rekonstituierten Transkriptionssystem von *Sulfolobus* konnte jedoch kein deutlicher Einfluss des Proteins auf die Initiation der Transkription, ausgehend vom eigenen Genpromotor, nachgewiesen werden. Dies legte zunächst die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Protein um ein generelles DNA-Bindeprotein handeln könnte, das durch Beeinflussung der DNA-Struktur an der Regulation der Transkription beteiligt sein könnte. Ein derartiger Mechanismus ist für das Protein Alba („Acetylation lowers binding affinity“) von *Sulfolobus solfataricus* beschrieben. Dabei handelt es sich um ein Chromatin-assoziiertes DNA-Bindeprotein, dass, je nachdem ob es in acetylierter oder deacetylierter Form vorliegt, unterschiedlich starke Affinität zur DNA aufweist und somit, auf Ebene der Änderung der Chromatinstruktur, die Initiation der Transkription beeinflusst (Bell *et al.*, 2002). Weitere Untersuchungen zur Bindspezifität des ORF 56-Proteins zeigten jedoch, dass das Protein mit hoher Spezifität an eine „inverted repeat“-Region des eigenen Promotors bindet und gegenüber anderen angebotenen DNA-Sequenzen keine Bindung erfolgt. Dass das Protein in den *in vitro*-Transkriptionsexperimenten keine deutliche Reaktion zeigte, kann jedoch mehrere Ursachen haben. Zum einen könnte die vollständige Aktivität des rekombinanten Proteins nicht gegeben sein und Bereiche, die nicht an die DNA binden, sondern Wechselwirkungen mit anderen Proteinen der Transkriptionsmaschinerie eingehen, sind nicht aktiv. Zum anderen könnte die Ursache jedoch auch im *in vitro*-System selbst liegen. Möglicherweise sind für eine regulatorische Aktivität des ORF 56 Proteins weitere, bisher noch unbekannte Komponenten nötig, die im basalen *in vitro*-Transkriptionssystem, bestehend aus TBP, TFB und RNA-Polymerase, nicht enthalten sind.

Die Transkriptionsstartpunkte von 13 Transkripten (52% aller identifizierten Transkripte) des SIRV1-Genoms wurden experimentell mittels „Primer Extension“ Analyse identifiziert. In der Regel konnte der Transkriptionsstart als eine Purinbase

identifiziert werden. Des Weiteren konnte in allen Fällen 20 bis 25 Nukleotide stromaufwärts des Transkriptionsstarts eine potentielle TATA Box sowie eine benachbarte Purin-reiche Region, die mit großer Wahrscheinlichkeit dem BRE-Element (Qureshi und Jackson, 1998) und somit der TFB Bindestelle (Bell und Jackson, 2000b) entspricht, gefunden werden. Die typischen Elemente des archaeellen Promotors, TATA-Box und BRE-Element, scheinen also auch im SIRV Promotor vorhanden zu sein (s. III.A.4). Vergleicht man die Lage der Promotorelemente der Rudiviren SIRV und auch deren TATA Box Sequenzen sind deutliche Ähnlichkeiten zum gut untersuchten *Sulfolobus*-Promotor zu erkennen (Bell *et al.*, 1999b; Soppa, 1999; Reiter *et al.*, 1990). Allerdings lässt sich die für den *Sulfolobus*-Promotor beschriebene Konsensussequenz $C_{/T}TT^A_{/T}A^A_{/T}A^A_{/T}$ (Bell *et al.*, 1999b) nicht auf den SIRV Promotor übertragen. Diese kann nur mit der sehr groben „Konsensussequenz“ $N^A_{/T}A^A_{/T}A^A_{/T}A^A_{/T}A^A_{/T}$ angegeben werden.

In neun von 13 kartierten Promotoren (70%), sowie in 4 von 5 per Sequenzanalyse bestimmten Promotoren (80%) von SIRV1, wurde unmittelbar stromabwärts der TATA-Box die Trinukleotidsequenz GTC identifiziert (s. III.A.4). Diese Sequenz konnte ebenfalls in den meisten Promotoren von SIRV2 gefunden werden. Ein derartig konserviertes Motiv ist bisher noch für keinen *Sulfolobus*-Promoter beschrieben worden. Bei der Überprüfung der für das Virus SSV1 beschriebenen Promotorsequenzen (Reiter *et al.*, 1987; Reiter *et al.*, 1988a) konnte das GTC-Motiv in zwei Promotoren (20%) identifiziert werden. Das massive Auftreten des Motivs in den Promotoren von SIRV1 und SIRV2 lässt vermuten, dass es sich hier um ein virusspezifisches *cis*-regulatorisches Element der Transkription handelt. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass dieselbe Trinukleotidsequenz GTC auch in Promotoren des erst kürzlich aus heißen Quellen in Italien isolierten Rudivirus ARV1 (Häring *et al.*, in Vorbereitung) vorhanden ist.

Promotoren mit dem GTC-Motiv könnten von spezifischen Virus- oder Wirtskodierten Faktoren erkannt werden. Eine zeitliche Regulation der Transkription über das GTC-Element kann jedoch insofern ausgeschlossen werden, da eine gleichzeitige Transkription von Promotoren mit und ohne GTC-Motiv erfolgt. Ebenfalls konnte keine Korrelation des Vorhandenseins eines GTC-Elements und auffällig stark oder schwach präsenster Transkripte nachgewiesen werden.

Bei den meisten Bakteriophagen, wie zum Beispiel beim T4 Phagen von *E. coli*, wird die Transkription der frühen Phagen-Gene dadurch gewährleistet, dass die entsprechenden Promotoren dieselben Konsensussequenzen wie die Wirtspromotoren aufweisen. Dadurch werden sie von der Wirts-RNA-Polymerase erkannt (Miller *et al.*, 2003; Mosig, 1999). Auch die meisten eukaryontischen DNA-Viren nutzen zur Transkription der Gene, deren Produkte früh im Laufe des Replikationszyklus benötigt werden, die Transkriptionsmaschinerie des Wirtes und regulieren ihren späten Zyklus über virusspezifische Regulatoren (Flint *et al.*, 2004). Obwohl es bei den Rudiviren SIRV1 und SIRV2 kaum eine zeitliche Regulation der Transkription gibt (s. III.A.1), weisen die SIRV-Promotoren spezifische Besonderheiten auf. Dies spricht dafür, dass eine andere Strategie genutzt wird, um die frühe Transkription der Virus-Gene zu gewährleisten. Verschiedene Mechanismen wären hierfür denkbar: 1. Mit der Infektion wird eine Virus-spezifische RNA-Polymerase und/oder ein regulatorisches Protein in die Zelle gebracht, was zu einer bevorzugten Transkription der Virus-Gene führt. Dies ist zum Beispiel bei den Pockenviren der Fall. Im Viruspartikel sind eine DNA-abhängige RNA-Polymerase sowie mehrere Proteine enthalten, die für die spezifische Erkennung der Promotoren der frühen Virus-Gene verantwortlich sind (Flint *et al.*, 2004). 2. Die Rudiviren könnten im Laufe der Evolution Promotoren entwickelt haben, die zum Beispiel durch ein spezifisches Enhancer-Element bevorzugt von den Faktoren des Wirtes erkannt werden. Das eukaryontische Simian Virus 40 (Affenvirus 40) enthält zum Beispiel einen frühen Promoter, sowie ein Enhancer-Element, das von zellulären Faktoren erkannt wird (Flint *et al.*, 2004). Zusätzlich könnte die Infektion selbst die Transkription stimulieren, indem zum Beispiel die Gene für die zelluläre RNA-Polymerase verstärkt exprimiert werden.

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob im Viruspartikel enthaltene Proteine, die bei der Infektion unweigerlich mit in die Wirtszelle gelangen, möglicherweise einen positiven Effekt auf die Initiation der Transkription haben, wurden *in vitro* Transkriptionsexperimente durchgeführt, bei denen zu den essentiellen Komponenten TBP, TFB und RNA-Polymerase, SIRV1-Gesamtproteinfraktion zugegeben wurde. Allerdings konnte unter allen gewählten Bedingungen keine Aktivierung oder Stimulation der Transkription der getesteten Promotoren nachgewiesen werden. Vielmehr zeigte sich, dass das Virus-Gesamtprotein die Initiation der Transkription negativ beeinflusst und in sehr hohen Konzentrationen zu

einer völligen Hemmung der Transkriptionsreaktion führt. Ein Artefakt, zum Beispiel durch Aggregation der in hoher Konzentration eingesetzten Virus-Proteine mit den Faktoren des Transkriptionssystems oder durch massive unspezifische Bindungsreaktionen der Virus-Proteine mit der Template-DNA, kann dabei jedoch nicht ausgeschlossen werden. Trotzdem legen die Ergebnisse eher die Vermutung nahe, dass die Rudiviren zur frühen Transkription ihrer Gene keine Strategie verfolgen, bei der eigene, an der Transkription beteiligte Enzyme oder Regulatoren bereits mit der Infektion in die Zelle eingebracht werden.

Mit den Promotorregionen der Leserahmen 134, 56 und 399 von SIRV1, die auch schon bei der *in vivo*-Analyse als potentielle regulatorische Schlüsselregionen auffielen, konnte über DNA Affinitätsreinigung aus Proteinrohextrakt von *Sulfolobus* ein an die Virus-Promotoren bindendes Protein gereinigt werden. Eine spezifische Bindung erschien wahrscheinlich, da in Gegenwart von pUC 18 Kompetitor-DNA mit den eingesetzten Promotoren stets dasselbe, einzige Protein gefischt werden konnte (s. III.B.1). Mit dem zur Kontrolle für die DNA-Affinitätsreinigung eingesetzten T6-Promotor konnte unter identischen Bedingungen kein Protein gewonnen werden. Es scheint ungewöhnlich, dass das isolierte 14 kDa-Protein zwar spezifisch an die eingesetzten Virus-Promotoren bindet, aber keinen viruscodierten Faktor darstellt. Auch in Versuchen, in denen Rohextrakte aus infizierten Zellen verwendet wurden, konnte kein anderes Ergebnis erzielt werden. Die starke Ähnlichkeit der Promotoren der Rudiviren zum archaellen Promotor lassen allerdings die Vermutung zu, dass an der Regulation der Transkription der SIRV-Gene nicht ausnahmslos Virus-spezifische Faktoren beteiligt sind. In den verwendeten Virus-Promotoren scheinen jedoch Sequenzmotive enthalten zu sein, zu denen das 14 kDa-Protein aus *Sulfolobus* eine starke Affinität aufweist.

Durch *in vitro*-Transkriptionsexperimente konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem 14 kDa-Protein tatsächlich um einen Transkriptionsfaktor handelt, der die Initiation der Transkription, ausgehend vom SIRV-Promotor 134 um ein 3 bis 4 faches, und ausgehend vom SIRV-Promotor 56 leicht um etwa $\frac{1}{3}$ stimuliert (s. III.B.1.2). Massenspektroskopische Untersuchungen des Proteins identifizierten es als das bisher als potentiellen Transkriptionsfaktor beschriebene Protein SSo0048 von *Sulfolobus solfataricus*. Es besitzt Ähnlichkeit zum Transkriptionsregulator Lrs14 (Bell und Jackson, 2000a; Napoli *et al.*, 1999) von *Sulfolobus solfataricus*. Dabei

handelt es sich um ein Homolog zum bakteriellen Lrp („leucine responsive regulatory protein“). Obwohl der archaeelle Promotor und auch dessen Transkriptionsmaschinerie signifikante Ähnlichkeit zum eukaryontischen RNA-Polymerase II-System aufweisen, enthalten die meisten archaeellen Genome potentielle Regulatoren, die mehr Ähnlichkeit zu bakteriellen als zu eukaryontischen regulatorischen Proteinen aufweisen (Kyrpides und Ouzounis, 1999; Aravind und Koonin, 1999). Auf welche Weise diese ein Transkriptionssystem, das eher dem eukaryontischen Modell gleicht, steuern, ist eine interessante Fragestellung. Einige der archaeellen Transkriptionsregulatoren wurden in *in vitro*-Studien untersucht: der metallabhängige Repressor MDR1 von *Archaeoglobus fulgidus* (Bell *et al.*, 1999a), das dazu Homologe LrpA von *Pyrococcus furiosus* (Brinkman *et al.*, 2000; Dahlke und Thomm, 2002), Lrs14 von *Sulfolobus solfataricus* (Bell und Jackson, 2000a) und Ptr2 von *Methanococcus jannaschii* (Ouhammouch *et al.*, 2003). Ein stimulierender oder aktivierender Effekt konnte bisher nur für Ptr2 gezeigt werden. Alle anderen Faktoren erwiesen sich als Repressoren. Neben diesem Aktivator ist in *in vitro*-Experimenten ein positiver regulatorischer Effekt nur für TFE, dem archaeellen Homolog zur α -Untereinheit des RNA-Polymerase II-Transkriptionsfaktors TFIIE gezeigt worden. Dabei wird angenommen, dass eine Interaktion zwischen TFE und TBP das Erkennen der TATA-Box erleichtert und/oder stabilisiert (Bell *et al.*, 2001). Mit dem über die SIRV Promotoren gereinigten Transkriptionsfaktor SSo0048 ist nun ein zweiter positiver Transkriptionsregulator nach bakteriellem Muster entdeckt worden.

Experimente mit dem rekombinant hergestellten SSo0048 zeigten, wie auch schon das native Protein, einen deutlich stimulierenden Effekt auf die Transkription des ORF 134-Gens des Rudivirus SIRV. Die Beobachtung, dass unter Abwesenheit des TATA-Bindeproteins auch in Gegenwart des Faktors SSo0048 keine Initiation der Transkription erfolgt, spricht deutlich für einen TBP-abhängigen Prozess. Möglicherweise erfolgt durch das SSo0048 Protein eine verstärkte Rekrutierung des TATA-Bindeproteins, was schließlich zur Stimulierung der Transkription führt. Gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass in Gegenwart von sehr geringen TBP-Mengen ein sehr deutlicher aktivierender Effekt zu sehen ist. Durch DNase I-Footprinting konnten zwei Regionen im Promoter identifiziert werden, die massiv durch das gebundene SSo0048 Protein geschützt werden (s. III.B.1.7). Ein Bereich erstreckt sich dabei über das BRE-Element und die TATA-Box stromabwärts bis zur

Position -8. Im Bereich stromabwärts der TATA-box befindet sich ein palindromisches Sequenzelement, an welches möglicherweise das Regulatorprotein SSo0048 bindet und damit die Bindung des TBP's unterstützt. Die zweite Region befindet sich stromaufwärts der TATA-Box um die Region -77 bis -108. Auch in dieser Region konnten gegenläufige Wiederholungssequenzen identifiziert werden, die Interaktionspunkte zwischen dem SSo0048 Protein und der Promotor DNA darstellen könnten. Eine Stimulierung der Transkription in Zusammenhang mit einer verstärkten Rekrutierung des TATA-Bindeproteins konnte für den Transkriptionsaktivator Ptr2 von *M. jannaschii* demonstriert werden (Ouhammouch *et al.*, 2003). Am Promotor des Rubredoxin-Gens (*rb2*) konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Aktivierung der Transkription des Gens in Verbindung mit einer zweiten Bindestelle, stromaufwärts der TATA-Box, zu sehen ist (Ouhammouch *et al.*, 2003). Eine exaktere Identifizierung der Bindestelle des SSo0048 sowie Mutationsanalysen und gezielte Experimente zur Interaktion der einzelnen Komponenten des Transkriptionsapparates könnten dazu beitragen, die an der Aktivierung der Transkription beteiligten Mechanismen weiter aufzuklären.

Im Hinblick auf die von den Rudiviren SIRV genutzte Strategie zur Regulation der Transkription ist der wirtskodierte Transkriptionsaktivator SSo0048 mit Sicherheit nur ein Einzelement, das zeigt, dass die Viren zur Transkription ihrer Gene zumindest Teile der Wirtsmaschinerie nutzen. Die spezifischen Elemente der SIRV Promotoren lassen vermuten, dass weitere, bisher noch unbekannte Faktoren für deren Erkennung nötig sind. Allerdings wäre es auch denkbar, dass das in den SIRV-Promotoren so auffällig präsente GTC-Motiv ein archaeeles Promotorelement darstellt, an welches sich die Rudiviren im Laufe der Evolution angepasst haben. Weitere bisher noch unentdeckte wirtskodierte Transkriptionsregulatoren könnten an deren Erkennung beteiligt sein. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse der *in vivo*-Transkriptionsanalyse wurden drei von 21 Promotoren von SIRV1 für die DNA-Affinitätsexperimente ausgewählt. Es ist keinesfalls auszuschließen, dass bei Verwendung anderer SIRV-Promotoren und/oder unter veränderten Versuchsbedingungen weitere Regulatoren gefunden werden könnten.

In allen Domänen des Lebens und den ubiquitär vorhandenen Viren scheint die Regulation der Transkription durch ein empfindliches Zusammenspiel mehrerer Komponenten bestimmt zu sein. Die Erforschung von Viren hyperthermophiler

Archaeen bietet die Möglichkeit, bisher noch unentdeckte Faktoren und Mechanismen zu finden und trägt dazu bei, die Diversität der Regulationsmechanismen auf Ebene der Transkription und deren Evolution näher zu erforschen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine erste systematische und detaillierte Studie zur Genexpression von Viren hyperthermophiler Crenarchaeota in Abhängigkeit des Infektionszyklus durchgeführt. Als Modellsystem dienten dabei die Rudiviren SIRV1 und SIRV2 des hyperthermophilen Archaeums *Sulfolobus*. Mittels Northern-Hybridisierungen, bei denen sowohl doppelsträngige DNA-Sonden als auch einzelsträngige Oligonukleotidsonden verwendet wurden, wurden für beide Viren detaillierte Transkriptionskarten erstellt. Die Transkription beider Genome beginnt gleichzeitig ausgehend von einer Vielzahl an Startpunkten, die über das gesamte Genom verteilt liegen. Beide Stränge werden transkribiert, wobei keiner von beiden bevorzugt wird. Der früheste Zeitpunkt, zu dem Virus-spezifische Transkripte beobachtet werden konnten, lag bei 30 min. nach der Infektion. Zu diesem Zeitpunkt waren alle Leserahmen, bis auf ORF 55 (SIRV1)/55c (SIRV2), transkribiert. Viele Gene bilden Blöcke und werden als polycistronische Boten-RNAs transkribiert. Von einigen Genen wird zusätzlich zum polycistronischen Transkript zu einem späteren Zeitpunkt ein separates Transkript gebildet. Im Fall des Strukturprotein-Gens 134 konnte 2 bis 3 h nach der Infektion, unmittelbar vor dem Virusassembly, ein stark präsenes monocistronisches Transkript beobachtet werden. Ebenfalls spät konnte die separate Expression des unmittelbar nach dem Strukturprotein in Gegenrichtung gelegenen Gens 55 (55c) beobachtet werden, was möglicherweise mit der Regulation der Transkription des Strukturproteins in Zusammenhang stehen könnte. 13 Transkriptionsstartpunkte und deren zugehörige Promotorbereiche konnten mittels „Primer Extension“-Analyse experimentell identifiziert werden. Ähnlich wie die Wirts-Promotoren enthalten die Virus-Promotoren die bekannten Bindestellen für die archaeellen Transkriptionsfaktoren TATA-Bindeprotein (TBP) und Transkriptionsfaktor B (TFB). Darüber hinaus enthalten die meisten die drei Nukleotide lange, Virus-spezifische Konsensussequenz GTC, die die Beteiligung alternativer Transkriptionsfaktoren vermuten lässt.

Auf der Suche nach entsprechenden Faktoren wurde aufgrund der Ergebnisse der *in vivo*-Transkriptionsanalyse zunächst das Genprodukt des Leserahmen ORF 56 untersucht. Für das Gen konnte ein separates, kleines, stark präsenes Transkript beobachtet werden, was eine mögliche regulatorische Funktion des Genprodukts vermuten lässt. Weiterhin konnte mittels Sequenzdatenanalyse im potentiellen Protein

ein für DNA-Bindeproteine typisches Helix-turn-Helix Motiv identifiziert werden. In Gel-Verzögerungstests mit dem rekombinant hergestellten Protein wurde eine spezifische DNA-Bindung an ein palindromisches Sequenzmotiv in der eigenen Promotorregion nachgewiesen. Im *in vitro*-Transkriptionsexperiment war für das Protein jedoch kein deutlicher Effekt zu beobachten.

Zur gezielten Suche nach weiteren Transkriptionsfaktoren wurden Virus-Promotoren in DNA-Affinitätsreinigungsexperimenten eingesetzt. Dabei konnte aus *Sulfolobus islandicus*-Rohextrakt ein Protein gereinigt werden, welches als potentieller Transkriptionsfaktor SSo0048 identifiziert werden konnte. Für das native wie auch für das rekombinant hergestellte Protein konnte in *in vitro*-Transkriptionsexperimenten ein stimulierender Effekt auf die Initiation der Transkription nachgewiesen werden. Dadurch konnte ein neuer archaeeller, positiver Transkriptionsregulator gefunden werden. Um Hinweise auf die Funktionsweise des Faktors zu erhalten, wurde mittels DNAase I-Footprinting die Promotorbindestelle untersucht. Dabei konnte eine Bindestelle stromaufwärts vom BRE-Element und der TATA-Box gefunden werden und eine zweite stromabwärts, die teilweise in die TATA-Box und in das BRE-Element hineinreicht. Weiterhin wurde für den stimulierenden Effekt im *in vitro*-Experiment eine Abhängigkeit vom TATA-Bindeprotein gezeigt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Ackermann, H. W.** 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review. *Arch. Virol.* **146**: 843-857.
- Allen, M. B.** 1959. Studies with *Cyanidium caldarium*, an anomalously pigmented chlorophyte. *Arch. Mikrobiol.* **32**: 270-277.
- Aravind, L. und E. V. Koonin.** 1999. DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Res.* **27**: 4658-4670.
- Arnold, H. P., W. Zillig, U. Ziese, I. Holz, M. Crosby, T. Utterback, J. F. Weidmann, J. K. Kristjanson, H. P. Klenk, K. E. Nelson und C. M. Fraser.** 2000a. A novel lipothrixvirus, SIFV, of the extremely thermophilic crenarchaeon *Sulfolobus*. *Virology* **267**: 252-266.
- Arnold, H. P., U. Ziese und W. Zillig.** 2000b. SNDV, a novel virus of the extremely thermophilic and acidophilic archaeon *Sulfolobus*. *Virology* **272**: 409-416.
- Bell, S. D., S. S. Cairns, R. L. Robson und S. P. Jackson.** 1999a. Transcriptional regulation of an archaeal operon *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell* **4**: 971-982.
- Bell, S. D., P. L. Kosa, P. B. Sigler und S. P. Jackson.** 1999b. Orientation of the transcription preinitiation complex in archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 13662-13667.
- Bell, S. D. und S. P. Jackson.** 2000a. Mechanism of autoregulation by an archaeal transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* **275**: 31624-31629.
- Bell, S. D. und S. P. Jackson.** 2000b. The role of transcription factor B in transcription initiation and promoter clearance in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biol. Chem.* **275**: 12934-12940.
- Bell, S. D., A. B. Brinkman, O. J. Van der Oost und S. P. Jackson.** 2001. The archaeal TFII α homologue facilitates transcription initiation by enhancing TATA-box recognition. *EMBO Rep.* **2**: 133-138.
- Bell, S. D., C. H. Botting, B. N. Wardleworth, S. P. Jackson und M. F. White.** 2002. The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. *Science* **296**: 148-151.
- Bettstetter, M., X. Peng, R. A. Garrett und D. Prangishvili.** 2003. AFV1, a novel virus infecting hyperthermophilic archaea of the genus *Acidianus*. *Virology* **315**: 68-79.
- Birkenbihl, R. P., K. Neef, D. Prangishvili und B. Kemper.** 2001. Holliday junction resolving enzymes of archaeal viruses SIRV1 and SIRV2. *J. Mol. Biol.* **309**: 1067-1076.
- Blum, H., H. Beier und H. J. Gross.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Blum, H., W. Zillig, S. Mallok, H. Domdey und D. Prangishvili.** 2001. The genome of the archaeal virus SIRV1 has features in common with genomes of eukaryal viruses. *Virology* **281**: 6-9.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

- Brinkman, A. B., I. Dahlke, J. E. Tuininga, T. Lammers, V. Dumay, H. E. de, J. H. Lebbink, M. Thomm, W. M. de Vos und O. J. Van der Oost.** 2000. An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated. *J. Biol. Chem.* **275**: 38160-38169.
- Brinkman, A. B., S. D. Bell, R. J. Lebbink, W. M. de Vos und O. J. Van der Oost.** 2002. The *Sulfolobus solfataricus* Lrp-like protein LysM regulates lysine biosynthesis in response to lysine availability. *J. Biol. Chem.* **277**: 29537-29549.
- Brock, T. D., K. M. Brock, R. T. Belly und R. L. Weiss.** 1972. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Mikrobiol.* **84**: 54-68.
- Campell, A. M.** 1999. Lambda Bacteriophage, p. 772-776. In: R. G. Webster und A. Granoff (eds.), *Encyclopedia of Virology*, vol. 2. Academic Press, San Diego, USA.
- Dahlke, I. und M. Thomm.** 2002. A *Pyrococcus* homolog of the leucine-responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogating RNA polymerase recruitment. *Nucleic Acids Res.* **30**: 701-710.
- Darcy, T. J., W. Hausner, D. E. Awery, A. M. Edwards, M. Thomm und J. N. Reeve.** 1999. *Methanobacterium thermoautotrophicum* RNA polymerase and transcription in vitro. *J. Bacteriol.* **181**: 4424-4429.
- Enoru-Eta, J., D. Gigot, T. L. Thia-Toong, N. Glansdorff und D. Charlier.** 2000. Purification and characterization of Sa-lrp, a DNA-binding protein from the extreme thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* homologous to the bacterial global transcriptional regulator Lrp. *J. Bacteriol.* **182**: 3661-3672.
- Feinberg, A. P. und B. Vogelstein.** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.
- Feinberg, A. P. und B. Vogelstein.** 1984. "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal. Biochem.* **137**: 266-267.
- Flint, S. J., L. W. Enquist, V. R. Racaniello und A. M. Skalka.** 2004. Principles of virology: Molecular biology, pathogenesis and control of animal viruses. ASM Press, Washington D.C.
- Frey, G., M. Thomm, B. Brudigam, H. P. Gohl und W. Hausner.** 1990. An archaeobacterial cell-free transcription system. The expression of tRNA genes from *Methanococcus vannielii* is mediated by a transcription factor. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1361-1367.
- Friedmann, D. I. und M. Gottesman.** 1982. Lytic mode of lamda development, p. 21-51. In: R. W. Hendrix, J. W. Roberts, F. W. Stahl und R. A. Weisberg (eds.), *Lambda II*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Gabrielsen, O. S., E. Hornes, L. Korsnes, A. Ruet und T. B. Oyen.** 1989. Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor t-a new purification principle for the ultrarapid isolation of near homogeneous factor. *Nucleic Acids Res.* **17**: 6253-6267.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hausner, W., G. Frey und M. Thomm.** 1991. Control regions of an archaeal gene. A TATA box and an initiator element promote cell-free transcription of the tRNA(Val) gene of *Methanococcus vannielii*. *J. Mol. Biol.* **222**: 495-508.

- Häring, M., X. Peng, K. Brugger, R. Rachel, K. O. Stetter, R. A. Garrett und D. Prangishvili.** 2004. Morphology and genome organization of the virus PSV of the hyperthermophilic archaeal genera *Pyrobaculum* and *Thermoproteus*: a novel virus family, the *Globuloviridae*. *Virology* **323**: 233-242.
- Hethke, C., A. C. Geerling, W. Hausner, W. M. de Vos und M. Thomm.** 1996. A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res.* **24**: 2369-2376.
- Hinton, D. M., R. March-Amegadzie, J. S. Gerber und M. Sharma.** 1996. Bacteriophage T4 middle transcription system: T4-modified RNA polymerase; AsiA, a sigma 70 binding protein; and transcriptional activator MotA. *Methods Enzymol.* **274**: 43-57.
- Hochheimer, A., R. Hedderich und R. K. Thauer.** 1999. The DNA binding protein Tfx from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: structure, DNA binding properties and transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.* **31**: 641-650.
- Huet, J., R. Schnabel, A. Sentenac und W. Zillig.** 1983. Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *EMBO J.* **2**: 1291-1294.
- Huber, H. und K. O. Stetter.** 1999. Crenarchaeota. In: Embryonic encyclopedia of life sciences. <http://www.els.net>.
- Hudepohl, U., W. D. Reiter und W. Zillig.** 1990. *In vitro* transcription of two rRNA genes of the archaeobacterium *Sulfolobus* sp. B12 indicates a factor requirement for specific initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 5851-5855.
- Kessler, A., A. B. Brinkman, O. J. Van der Oost und D. Prangishvili.** 2004. Transcription of the rod-shaped viruses SIRV1 and SIRV2 of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus*. *J. Bacteriol.* **186**: 7745-7753.
- Krüger, K., T. Hermann, V. Armbruster und F. Pfeifer.** 1998. The transcriptional activator GvpE for the halobacterial gas vesicle genes resembles a basic region leucine-zipper regulatory protein. *J. Mol. Biol.* **279**: 761-771.
- Kyrpides, N. C. und C. A. Ouzounis** 1999. Transcription in archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 8545-8550.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Martin, A., S. Yeats, D. Janekovic, W.-D. Reiter, W. Aicher und W. Zillig.** 1984. SAV1, a temperate u.v.-inducible DNA virus like particle from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius* isolate B12. *EMBO J.* **3**: 2165-2168.
- Miller, E. S., E. Kutter, G. Mosig, F. Arisaka, T. Kunisawa und W. Ruger.** 2003. Bacteriophage T4 genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 86-156.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Modrow, S., D. Falke und U. Truyen.** 2003. Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

- Molineux, I. J.** 1999. T7 Bacteriophage, p. 1388-1396. *In*: R. G. Webster und A. Granoff (eds.), *Encyclopedia of Virology*, vol. 3. Academic Press, San Diego, USA.
- Mosig, G.** 1999. T4 Bacteriophage and related Bacteriophages, p. 1376-1383. *In*: R. G. Webster und A. Granoff (eds.), *Encyclopedia of Virology*, vol. 3. Academic Press, San Diego, USA.
- Napoli, A., O. J. Van der Oost, C. W. Sensen, R. L. Charlebois, M. Rossi und M. Ciaramella.** 1999. An Lrp-like protein of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* which binds to its own promoter. *J. Bacteriol.* **181**: 1474-1480.
- Ouhammouch, M., R. E. Dewhurst, W. Hausner, M. Thomm und E. P. Geiduschek.** 2003. Activation of archaeal transcription by recruitment of the TATA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 5097-5102.
- Peng, X., H. Blum, Q. She, S. Mallok, K. Brugger, R. A. Garrett, W. Zillig und D. Prangishvili.** 2001. Sequences and replication of genomes of the archaeal rudiviruses SIRV1 and SIRV2: relationships to the archaeal lipothrixvirus SIFV and some eukaryal viruses. *Virology* **291**: 226-234.
- Prangishvili, D., W. Zillig, A. Gierl, L. Biesert und I. Holz.** 1982. DNA-dependent RNA polymerases of thermoacidophilic archaebacteria. *Eur. J. Biochem.* **122**: 471-477.
- Prangishvili, D., H. P. Klenk, G. Jakobs, A. Schmiechen, C. Hanselmann, I. Holz und W. Zillig.** 1998. Biochemical and phylogenetic characterization of the dUTPase from the archaeal virus SIRV. *J. Biol. Chem.* **273**: 6024-6029.
- Prangishvili, D., H. P. Arnold, D. Gotz, U. Ziese, I. Holz, J. K. Kristjansson und W. Zillig.** 1999. A novel virus family, the *Rudiviridae*: Structure, virus-host interactions and genome variability of the *Sulfolobus* viruses SIRV1 and SIRV2. *Genetics* **152**: 1387-1396.
- Prangishvili, D., K. Stedman und W. Zillig.** 2001. Viruses of the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Trends Microbiol.* **9**: 39-43.
- Prangishvili, D.** 2003. Evolutionary insights from studies on viruses of hyperthermophilic archaea. *Res. Microbiol.* **154**: 289-294.
- Prangishvili, D. und R. A. Garrett.** 2004. Exceptionally diverse morphotypes and genomes of crenarchaeal hyperthermophilic viruses. *Biochem. Soc. Trans.* **32**: 204-208.
- Ptashne, M. A.** 1992. Genetic switch. Cell Press and Blackwell Scientific Publications, Cambridge.
- Qureshi, S. A., P. Baumann, T. Rowlands, B. Khoo und S. P. Jackson.** 1995. Cloning and functional analysis of the TATA binding protein from *Sulfolobus shibatae*. *Nucleic Acid Res.* **23**: 1775-1781.
- Qureshi, S. A., S. D. Bell und S. P. Jackson.** 1997. Factor requirements for transcription in the Archaeon *Sulfolobus shibatae*. *EMBO J.* **16**: 2927-2936.
- Qureshi, S. A. und S. P. Jackson.** 1998. Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength. *Mol. Cell* **1**: 389-400.
- Reiter, W.-D., P. Palm, S. Yeats und W. Zillig.** 1987. Gene expression in archaebacteria: Physical mapping of constitutive and UV-inducible transcripts from the *Sulfolobus* virus-like particle SSV1. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 270-275.

- Reiter, W. D., P. Palm und W. Zillig.** 1988a. Analysis of transcription in the archaeobacterium *Sulfolobus* indicates that archaeobacterial promoters are homologous to eukaryotic pol II promoters. *Nucleic Acids Res.* **16**: 1-19.
- Reiter, W. D., P. Palm und W. Zillig.** 1988b. Transcription termination in the archaeobacterium *Sulfolobus*: signal structures and linkage to transcription initiation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 2445-2459.
- Reiter, W. D., U. Hudepohl und W. Zillig.** 1990. Mutational analysis of an archaeobacterial promoter: essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87** : 9509-9513.
- Roeder, R. G.** 1996. Nuclear RNA polymerases: role of general initiation factors and cofactors in eukaryotic transcription. *Methods Enzymol.* **273**: 165-171.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis und H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich und N. Arnheim.** 1992. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology* **24**: 476-480.
- Sanger, F., G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, C. A. Fiddes, C. A. Hutchison, P. M. Slocombe und M. Smith.** 1977. Nuclotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**: 687-695.
- Schleper, C., K. Kubo und W. Zillig.** 1992. The particle SSV1 from the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* is a virus: demonstration of infectivity and of transfection with viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 7645-7649.
- She, Q., R. K. Singh, F. Confalonieri, Y. Zivanovic, G. Allard, M. J. Awayez, C. C. Chan-Weiher, I. G. Clausen, B. A. Curtis, M. A. De, G. Erauso, C. Fletcher, P. M. Gordon, J. Heikamp-de, I, A. C. Jeffries, C. J. Kozera, N. Medina, X. Peng, H. P. Thi-Ngoc, P. Redder, M. E. Schenk, C. Theriault, N. Tolstrup, R. L. Charlebois, W. F. Doolittle, M. Duguet, T. Gaasterland, R. A. Garrett, M. A. Ragan, C. W. Sensen und O. J. Van der Oost.** 2001. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 7835-7840.
- Soppa, J.** 1999. Normalized nucleotide frequencies allow the definition of archaeal promoter elements for different archaeal groups and reveal base-specific TFB contacts upstream of the TATA box. *Mol. Microbiol.* **31**: 1589-1592.
- Stedman, K. M., Q. She, H. Phan, H. P. Arnold, I. Holz, R. A. Garrett und W. Zillig.** 2003. Relationships between fuselloviruses infecting the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*: SSV1 and SSV2. *Res. Microbiol.* **154**: 295-302.
- Stetter, K. O.** 1996. Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol. Reviews* **18**: 149-158.
- Tang, S. L., S. Nuttall, K. Ngui, C. Fisher, P. Lopez und M. Dyll-Smith.** 2002. HF2: a double-stranded DNA tailed haloarchaeal virus with a mosaic genome. *Mol. Microbiol.* **44**: 283-296.
- Thomm, M. und G. Wich.** 1988. An archaeobacterial promoter element for stable RNA genes with homology to the TATA box of higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **16**: 151-163.

Tyree, C. M., C. P. George, L. M. Lira-DeVito, S. L. Wampler, M. E. Dahmus, L. Zawel und J. T. Kadonaga. 1993. Identification of a minimal set of proteins that is sufficient for accurate initiation of transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev.* **7**: 1254-1265.

Vierke, G., A. Engelmann, C. Hebbeln und M. Thomm. 2003. A novel archaeal transcription regulator of heat shock response. *J. Biol. Chem.* **278**: 18-26.

Weidenheft, B., K. Stedman, F. Roberto, D. Willits, A.-K. Gleske, L. Zoeller, J. Snyder, T. Douglas und M. Young. 2004. Comparative genomic analysis of hyperthermophilic archaeal *Fuselloviridae* viruses. *J. Virol.* **78**: 1954-1961.

Williams, K. P., G. A. Kassavetis, D. R. Herendeen und E. P. Geiduschek. 1994. Regulation of late-gene expression, p. 161-175. *In*: J. Karam, J. W. Drake, K. N. Kreuzer, G. Mosig, D. H. Hall, F. A. Eiserling, L. W. Black, E. K. Spicer, E. Kutter, K. Carlson, and E. S. Miller (eds.), *Molecular biology of bacteriophage T4*. American Society for Microbiology, Washington D.C.

Zillig, W., K. O. Stetter und D. Janekovic. 1979. DNA-dependent RNA polymerase from the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Eur. J. Biochem.* **96**: 597-604.

Zillig, W., P. Palm, H. P. Klenk, D. Langer, U. Hüdepohl, J. Hain, M. Lanzendörfer und I. Holz. 1993. Transcription in archaea, p. 367-391. *In*: M. Kates and D. J. Kushner (eds.), *The biochemistry of archaea (archaebacteria)*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, Niederlande.

Zillig, W., A. Kletzin, C. Schleper, I. Holz, D. Janekovic, J. Hain, M. Lanzendörfer und J. K. Kristjansson. 1994. Screening for *Sulfolobales*, their plasmids and their viruses in icelandic solfataras. *System. Appl. Microbiol.* **16**: 609-628.

Zillig, W., D. Prangishvili, C. Schleper, M. Elferink, I. Holz, S. Albers, D. Janekovic und D. Gotz. 1996. Viruses, plasmids and other genetic elements of thermophilic and hyperthermophilic Archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**: 225-236.

Zillig, W., H. P. Arnold, I. Holz, D. Prangishvili, A. Schweier, K. Stedman, Q. She, H. Phan, R. Garrett und J. K. Kristjansson. 1998. Genetic elements in the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Extremophiles*. **2**: 131-140.

Bedanken möchte ich mich bei...

... **Prof. Dr. Karl O. Stetter** für die Möglichkeit die Arbeit unter seiner Leitung anzufertigen. Sein in mich gesetztes Vertrauen, seine Unterstützung und seine Diskussionsbereitschaft waren mir dabei eine große Hilfe.

... **Dr. habil. David Prangishvili** für die Betreuung der Arbeit, seine zahlreichen Anregungen und seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft. Besonders danke ich ihm für seine engagierte Förderung und für die lohnenden Forschungsaufenthalte in Wageningen und Cambridge.

... **Prof. Dr. Steve Bell** für die überaus freundliche Aufnahme in seinem Labor, die fundierte Einarbeitung in das *in vitro*-System und seine engagierte Unterstützung. Dem gesamten „Bell-lab“ danke ich für die tolle Zeit in Cambridge.

... **Prof. Dr. John van der Oost und Dr. Arjen Brinkman** für die Zusammenarbeit bei der „Primer Extension“-Analyse und für ihre Gastfreundschaft.

... **Prof. Dr. Reinhard Rachel** für wissenschaftliche Diskussionen und seine fachkundige Hilfe bei Computerproblemen.

... **Dr. Harald Huber** für sein offenes Ohr und seine Hilfs- und Einsatzbereitschaft.

... **Monika Häring und Werner Reitberger** für das angenehme Labor-Klima und für die vielen, nicht nur wissenschaftlichen Diskussionen.

... **Elisabeth Nagelfeld** für ihre Unterstützung in organisatorischen Dingen und ihre aufmunternden Worte.

... **allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Lehrstuhls**, die zu der guten, freundschaftlichen Atmosphäre beigetragen haben.

... **meinen Eltern**, die mich durch ihr Interesse und ihr Verständnis immer unterstützt haben.

... **Wolfgang Eder** für das Begleiten durch alle Höhen und Tiefen während der Promotion. Danke für Dein Verständnis, Deine Geduld und fürs Zuhören!